

Aus dem Institut für Veterinärpathologie
der Vetsuisse-Fakultät
Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. A. Pospischil

Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. F. Ehrensperger

**Epidemiologische Untersuchungen zur Borna Disease Virus Infektion
in Schafbeständen und Suche nach möglichen Vektoren im
Endemiegebiet der Schweiz**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Romana Herrsche

Tierärztin

von Lohn (SO)

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. F. Ehrensperger, Referent

PD. Dr. M. Engels, Korreferent

Zürich 2007
Zentralstelle der Studentenschaft

1	Zusammenfassung	4
2	Abstract	5
3	Einleitung und Fragestellung	6
4	Literaturübersicht	8
4.1	Borna Disease Virus (BDV)	8
4.2	Geschichte	9
4.3	Pathogenese und Klinik bei Pferd und Schaf	10
4.4	Vektoren und Epidemiologie	12
5	Material und Methoden	14
5.1	Material	14
5.1.1	Schafe aus dem Endemiegebiet	14
5.1.2	Mäuse, Feld-, Waldspitzmäuse und Maulwürfe	15
5.2	Methoden	16
5.2.1	Immunhistologie	16
5.2.2	Serologie	17
5.2.3	Real-Time RT-PCR	18
6	Resultate	22
6.1	Bestand 1	22
6.1.1	Bestandesuntersuchung Serologie	22
6.1.2	Real-Time RT-PCR	25
6.2	Verlaufsuntersuchung an zwei Schafen aus dem Bestand 1	27
6.2.1	Serologie	27
6.2.2	Real-Time RT-PCR	28
6.2.3	Sektion	31
6.3	Bestand 2	32
6.3.1	Histologie und Immunhistologie	32
6.3.2	Real-Time RT-PCR	34
6.3.3	Bestandesuntersuchung Serologie	35
6.4	Mäuse, Spitzmäuse und Maulwürfe	36
6.4.1	Histologie und Immunhistologie	36
6.4.2	Real-Time RT-PCR	38
6.4.3	Sequenzierung	40
7	Diskussion	41
7.1	Bestand 1	41
7.1.1	Serologie	41
7.1.2	Real-Time RT-PCR	42
7.2	Verlaufsuntersuchung der 2 Schafe aus dem Bestand 1	43
7.2.1	Serologie	43
7.2.2	Real-Time RT-PCR	44
7.2.3	Histologie, Immunhistologie und Real-Time RT-PCR am Gewebe	45
7.2.4	Schlussfolgerung zu den Verlaufsuntersuchungen	45
7.3	Bestand 2	47
7.3.1	Histologie und Immunhistologie	47
7.3.2	Real-Time RT-PCR	47
7.3.3	Serologie	47

7.4	Mäuse, Spitzmäuse und Maulwürfe	48
7.4.1	Histologie und Immunhistologie	48
7.4.2	Real-Time RT-PCR	49
7.4.3	Crocidura leucodon	50
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	51
Anhang		56

1 Zusammenfassung

Die Borna Disease (BD) ist eine sporadisch auftretende virale Erkrankung des Zentralnervensystems, welche vorwiegend bei Schafen und Pferden vorkommt. Die Infektionsquelle ist unbekannt, klinisch inapparente Trägartiere (mit Virusausscheidung) bei den Schafen und Vektoren werden diskutiert.

In die vorliegende Studie wurden zwei Schafbestände einbezogen, in denen kürzlich klinische BD Fälle aufgetreten waren. Es konnte in beiden Beständen eine hohe Seroprävalenz festgestellt werden. Im Bestand 1 nahm sie an vier Entnahmezeitpunkten über 16 Monate hinweg von 39.53 bis auf 84.4 % zu. Im Bestand 2 betrug die Seroprävalenz bei einer einmaligen Blutuntersuchung von 60 der insgesamt 500 Schafe 56.7%. Mittels Real-Time RT-PCR konnte bei keinem der 46 untersuchten Schafe des Bestandes 1 Borna Disease Virus (BDV)-RNA in Blut, Maulhöhlen- oder Nasensekret nachgewiesen werden. Auch bei zwei seropositiven Schafen aus diesem Bestand, welche wiederholt untersucht werden konnten, wurde keine BDV-RNA in Sekreten, Organen oder Gehirn nachgewiesen.

Im Zuge der Untersuchungen für das Auffinden eines möglichen Vektors wurden 193 Mäuse, Spitzmäuse und Maulwürfe aus dem Endemiegebiet untersucht. Drei Feldspitzmäuse reagierten in Real-Time RT-PCR und in der Immunhistologie im Gehirn und in der Herzmuskulatur (IHC 1 von 3) klar positiv. Die Sequenzierung der gefundenen BDV-Genomabschnitte ergab 99,9% Homologie mit einem Pferdeisolat aus der betreffenden Gegend, eine Kontamination mit unserem Laborstamm konnte ausgeschlossen werden.

2 Abstract

Borna disease is a viral disorder of the central nervous system predominantly in horses and sheep. The origin of infection is unknown until now, clinical healthy carriers or vectors are possible.

In this thesis two different sheep herds with a recent case of clinical Borna disease were examined. High titers of antibodies against BD virus (BDV) were detectable in both herds, using an indirect immunofluorescence assay.

In the first herd the seroprevalence increased from 39.53 to 84.4%, based on four blood withdrawals within a period of 16 months. BDV-RNA could not be detected by Real-Time RT-PCR in blood, mouth cavity or nasal secretions collected from all animals of this herd. Repeated examinations of two seropositive sheep from the same herd presented no traces of BDV-RNA in secretions, organs or brain.

In the second herd we found 56.7% of the sheep with anti-BDV antibodies upon a single examination.

Further investigations into the detection of possible vectors included the examination of 193 mice, shrews and moles from the endemic area.

Using Real-Time RT-PCR and immunohistology, the brain and myocardial muscle tissue of three shrews proved positive. Sequencing of the PCR product revealed a 99.9% homology to a BDV strain isolated from a horse from the same geographic area.

The possibility of a cross contamination of the strains within the laboratory could be excluded.

3 Einleitung und Fragestellung

Borna Disease (BD) ist eine virusbedingte, sporadisch auftretende, meist progressiv und letal verlaufende immunpathologische Erkrankung des zentralen Nervensystems, welche vorwiegend bei Pferden und Schafen vorkommt. Daneben können auch andere Equiden, Rinder, Ziegen, Nagetiere, Hunde, Katzen, Strausse und Zootiere wie zum Beispiel Lamas, Alpakas, Faultiere und Affen natürlich mit dem Borna Disease Virus (BDV) infiziert werden.^{6,10,22} Experimentelle Infektionen sind bei einem breiten Spektrum von Tieren möglich, von höheren Säugetieren bis zu Nagetieren wie Mäusen.²¹

Viele Kenntnisse zur Pathogenese der BDV Infektion wurden aus experimentellen Infektionen an Ratten und Mäusen gewonnen. Nach wie vor sind aber sehr viele relevante Fragen ungeklärt, zum Beispiel wie die Übertragung erfolgt, ob Vektoren in der Übertragungskette eine Rolle spielen und wenn ja, welche Tierarten als Vektoren fungieren können.

Zum heutigen Zeitpunkt kann intra vitam bei einem erkrankten Tier mit dem typischen klinischen Bild BD lediglich als Verdachtsdiagnose gestellt werden. Eine definitive Diagnosestellung ist erst post mortem mittels Immunhistologie und Real-Time RT-PCR an Gehirnmateriel möglich.

Über die Seroprävalenz bei Schafen wurden in der Vergangenheit bereits verschiedene Untersuchungen in den Endemiegebieten der Schweiz durchgeführt, wie zum Beispiel im Rahmen der Dissertation Götzmann (2001)¹³. Serologische Untersuchungen auf Bestandesebene ergeben eine Übersicht über den herrschenden Infektionsdruck in der betreffenden Herde oder in einem bestimmten Gebiet. Jedoch lässt dies keine sicheren Rückschlüsse auf mögliche aktuelle Infektionen der untersuchten Tiere zu. Antikörper im Blut lassen lediglich den Schluss zu, dass das betreffende Tier einmal mit dem BDV infiziert war. Für den Nachweis einer aktuellen Virusinfektion wäre der Antigen- oder RNA Nachweis aus Geweben, Sekreten und evtl. Blut notwendig.

Das Ziel dieser Dissertation war es, einen Schafbestand mit einem kürzlich aufgetretenen und post mortem bestätigten BD Fall genauer zu untersuchen und zu überprüfen, ob das Virus in Sekreten aus Nasen- und Maulhöhle oder im Blut klinisch gesunder Schafe nachweisbar ist. Bei zwei Schafen aus diesem Bestand wurden die gleichen Proben über einen Zeitraum von fünf Wochen mehrmals entnommen und untersucht. Zusätzlich wurden nach der Euthanasie das Gehirn und weitere Organe analysiert.

Ein weiteres Ziel war die Ermittlung der Seroprävalenz im erwähnten und in einem weiteren Bestand mit bestätigten BD Fällen und die Suche nach möglichen Vektoren, welche die BD übertragen können.

4 Literaturübersicht

4.1 Borna Disease Virus (BDV)

Es handelt sich beim BDV um ein nicht-zytopathogenes, behülltes Virus mit einer nicht-segmentierten, negativ polarisierten RNA als Genom, welches eine Grösse von 8.9 kb besitzt. Elektronenmikroskopisch haben die Viruspartikel eine sphärische Gestalt mit einem Durchmesser von 70-130 nm^{5,9,41} und tragen spikeartige Fortsätze mit einer ungefähren Länge von 7.0 nm.¹⁸ BD Viren gelangen mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zelle, wo durch Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran der Ribonukleoproteinkomplex freigesetzt und in den Zellkern transportiert wird. Alternativ wird auch ein Einschleusen des Ribonukleoproteinkomplex in die Zelle via Fusion von Virushülle und Zellmembran diskutiert. (Ref.XX) Die Replikation und Transkription des Genoms erfolgt im Kern und der zelluläre Splicingapparat wird verwendet um die Genexpression zu regulieren. Diese Eigenschaft ist ungewöhnlich für Viren mit unsegmentierter RNA als Genom, weshalb das Bornavirus als Prototyp einer neuen Virusfamilie, der Familie der Bornaviridae innerhalb der Ordnung Mononegavirales, angesehen wird.³⁷ Zu dieser Ordnung gehören ebenfalls die Filoviridae, Paramyxoviridae und Rhabdoviridae.

Durch den Neurotropismus erfolgt die Replikation bevorzugt in Neuronen und Astrozyten, jedoch können auch Oligodendrozyten und Ependymzellen infiziert werden.³¹ Das Vorkommen von BDV in PBMC's (Peripheral blood mononuclear cells) wird ebenfalls beschrieben.^{3,26,27,36}

Auf dem Genom sind sechs Open Reading Frames (ORF's) lokalisiert. Diese kodieren für das Nukleoprotein (N) p38/p40 (ORF I), das Phosphoprotein (P) p24 (ORF II), das Matrixprotein (M) p16 (ORF III), das Glykoprotein (G) p56 (ORF IV), die RNA Polymerase (L) p180 (ORF V) und das Protein (X) p10 (ORF X)(Abb. 1).⁸ Das vollständige Genom konnte 1994 sequenziert werden.²⁵

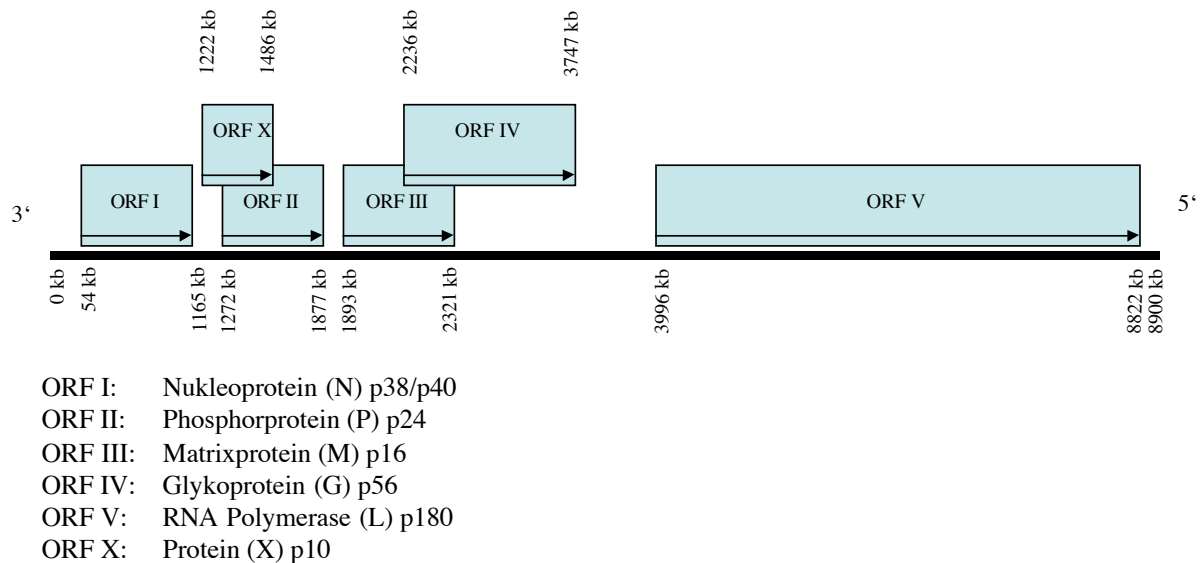


Abb. 1. Darstellung der 6 ORF-Regionen im Genom des Borna Disease Virus.

4.2 Geschichte

Da BD eine Krankheit ist, die mit neurologischen Störungen und Änderungen des Verhaltens einhergeht, wurde sie früher auch als „Hitze Kopfkrankheit“ oder „Kopffieber“ bezeichnet.²⁹

Benannt wurde diese Krankheit nach dem Namen der Stadt Borna (Sachsen) in der 1894 bis 1896 mehrere hundert Pferde erkrankten und starben.¹⁴ Im Jahre 1909 wurden von Joest und Degen die typischen histologischen Veränderungen im Gehirn mit den nach ihnen benannten Einschlusskörperchen beschrieben.¹⁶ Diese sind im Durchmesser 1-6µm gross, eosinophil und befinden sich in Kernen von Nervenzellen und Astrozyten.

1976 wurden in der Schweiz die ersten Fälle von BD in einer Schafherde diagnostiziert.^{23,25}

Heute sind natürliche BDV Infektionen bei Schafen und Pferden in bestimmten Gebieten in Deutschland, Schweiz, Österreich und dem Fürstentum Liechtenstein endemisch vorhanden. In der Schweiz betrifft dies v.a. Teile des Kantons Graubünden und des St. Galler Rheintales. (Abb.2).^{6,21,40}



Abb. 2. → BD-Fälle bei Schafen in der Schweiz von 1995 bis 2005. Nicht aufgezeigt sind 1 Fall unbekannter Herkunft, 1 Fall aus dem Kanton Zürich, 1 Fall aus dem Kanton Graubünden und 7 Fälle im Fürstentum Liechtenstein.

4.3 Pathogenese und Klinik bei Pferd und Schaf

Basierend auf dem Rattenmodell ist die vermutete Eintrittspforte für das Virus die intakte Nasenschleimhaut, im besonderen die olfaktorischen Rezeptorzellen. Durch axonalen Transport gelangt das Virus in das Gehirn, wo die Virusreplikation erfolgt.⁷ Als Prädilektionsstellen im Gehirn werden das limbische System, der Thalamus und der Hypothalamus angesehen. Die Inkubationszeit beträgt bei experimentellen Infektionen von Ratten mindestens zwei Wochen, wobei dies von dem Erregerstamm und der Empfänglichkeit des Wirtes abhängig ist.³⁸ Ebenfalls ist sie abhängig vom Ort der Virusinokulation. Bei Ratten wurde BDV intrazerebral, intranasal und intramuskulär im Gastrocnemiusbereich verabreicht. Die ersten Symptome traten bei Ratten bei intrazerebraler und intranasaler Inokulation nach ungefähr 18 Tagen auf. Bei der intramuskulären Injektion wurde die Krankheit nach ungefähr

45 Tagen manifest. Daraus kann die Vermutung abgeleitet werden, dass je weiter die Inokulationsstelle vom Gehirn entfernt ist, desto länger dauert die Inkubationszeit. Ebenfalls beeinflusst die Virusmenge die Dauer bis zum Auftreten der ersten Symptome, je höher die verabreichte Menge desto kürzer die Zeitspanne.⁷ Es ist eine experimentelle Untersuchung mit intrazerebraler BDV Infektion von Ponys aus den USA bekannt. Die Inkubationszeit betrug abhängig von der inokulierten Virusmenge mindestens zwei Wochen. Die Tiere zeigten die klassischen BD-Symptome wie Ataxie, Kreiswandern, unnatürliche Körperhaltungen, Kopfschiefhaltung, Muskelzittern und Hyperästhesie. Ebenfalls vorhanden waren Bewusstseinstörungen, Kopfschwanken und schmatzen. Zwei der drei infizierten Ponys waren innerhalb der ersten 72 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome moribund und wurden euthanasiert. Das dritte Pony, welches die niedrigste Virusdosis erhielt, stabilisierte und erholte sich. Zwei Wochen später zeigte es jedoch Hyperaktivität und Aggressivität und wurde infolgedessen euthanasiert. Die histologischen Befunde entsprachen den typischen Läsionen von BD. BDV-spezifische Antikörper waren erst nach Auftreten der ersten Symptome und hohe Antikörper-Titer nur beim rekonvaleszenten Tier vorhanden.¹⁷

Bei natürlichen Infektionen wird vermutet, dass die Inkubationszeit ebenfalls mindestens zwei Wochen bis mehrere Monate andauern kann.³⁵ Der Krankheitsverlauf kann variieren zwischen inapparent und massiven klinischen Symptomen, die mit dem Tod enden.

Beim Pferd kann diese Krankheit perakut, akut oder subakut verlaufen und mit Ausbildung einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis einhergehen. In frühen Phasen zeigen sich Änderungen im Verhalten und im Bewusstsein, langsames oder sistierendes Futterkauen und rezidivierendes Fieber.^{10,14}

Mit zunehmender Krankheitsdauer werden die neurologischen Störungen progressiv stärker. Es entwickeln sich Muskelkrämpfe, Ängstlichkeit, Nervosität, ungewöhnliche Aggressivität oder Lethargie, Somnolenz und Stupor. In einem sehr fortgeschrittenen Stadium erfolgt eine Verminderung der Spinalreflexe, Kopfschiefhaltung und Hypoaesthesie mit Beeinträchtigung der Propriozeption. Zu diesem späten Zeitpunkt werden bei verschiedenen Tierarten, wie zum Beispiel auch bei Labortieren, oft Ataxie, Gleichgewichtsstörungen, abnorme Reaktionen auf externe Reize und unphysiologische Körperhaltungen beobachtet. Im weiteren entwickeln sich nach und nach Dysphagie und Speicheln, verminderter Zungentonus und -bewegung, Zähneknirschen, Trismus, Lähmung des Nervus facialis, Nystagmus, Strabismus und Miosis. Im Endstadium kann eine neuronal bedingte Tortikollis, eventuell mit Kreiswandern, Kopftremor, Konvulsionen mit Wanddrängen und schliesslich Koma auftreten.

Durch die Anorexie entwickeln sich eine Hyperalbuminämie und ikterische Maulschleimhäute.

Bei mehr als 80 Prozent der erkrankten Pferde tritt der Tod innerhalb einer bis vier Wochen nach Beginn der ersten klinischen Symptome ein.¹⁴

Wenn ein Pferd das akute Stadium überlebt, bleiben häufig Veränderungen im Verhalten wie Depressionen mit Apathie, Somnolenz oder Ängstlichkeit erhalten.²⁹

Beim Schaf verläuft die Krankheit unter einem sehr ähnlichen klinischen Bild, jedoch treten die Bewegungs- und Verhaltensanomalien deutlicher in Erscheinung und zusätzlich wird eine Absonderung von der Herde und häufiges Niederstürzen beobachtet.^{6,25}

4.4 Vektoren und Epidemiologie

Eine weitere zentrale Frage, die bis anhin ungenügend geklärt ist, ist der genaue Übertragungsweg der BD. Erfolgt dieser durch den direkten Kontakt unter den empfänglichen Haustieren oder sind Vektoren im Spiel? Gegen eine Tier zu Tier Übertragung spricht unter anderem das sporadische Auftreten der Krankheit, sogar in sehr grossen Beständen erkrankt meist nur ein Einzeltier. Auch Tiere, welche mit BD-kranken Tieren direkten Kontakt hatten, sind nach unserem Wissen noch nie an BD erkrankt. Gemäss Literatur sind ebenfalls keine dahingehenden Beobachtungen publiziert worden. In irgendeiner Form muss das Virus in den Zeitspannen zwischen den auftretenden manifesten BD Fällen vorhanden sein. In der älteren Literatur wurde angenommen, dass sich das Virus im Boden befindet und dementsprechend wurde von einer „Bodenseuche“ gesprochen.

In neuerer Zeit haben sich verschiedene Hinweise auf Vektoren ergeben, jedoch eine abschliessende Antwort auf die Frage, wie die Übertragung erfolgt, steht nach wie vor aus. Aufgrund von experimentellen Infektionen an Labortieren, gelten Nagetiere wie Mäuse und Ratten als Vektorkandidaten.

Neonatal mit BDV infizierte Ratten bleiben frei von Symptomen, jedoch kann BDV-RNA in beinahe allen Organen, im Urin und im Speichel festgestellt werden.^{15,24} Werden die neonatal infizierten Ratten mit gesunden adulten Ratten in einen Käfig verbracht, zeigen die adulten Ratten innert 27 bis 46 Tage die ersten neurologischen Symptome. Sie entwickeln typische klinische Anzeichen für die klassische BD und zeigen perivaskuläre und parenchymale Ansammlungen von mononukleären Entzündungszellen im Gehirn.³²

In Schweden konnte im Kot von Stockenten und einer Lachmöwe aus Gebieten mit feliner BD (Staggering Disease) BDV -RNA nachgewiesen werden.² Daraus wurde abgeleitet, dass Vögel eine Rolle in der Übertragung von BDV spielen könnten.

Auch Zecken wurden als Vektoren diskutiert. Experimentell infizierte Zecken beherbergten dass BDV über einen Zeitraum von bis zu 24 Tage nach der Infektion, aber die entsprechenden Viruskopienzahlen waren relativ niedrig. Zecken können somit als Vektoren nicht definitiv ausgeschlossen werden.³⁴

Der Frage, ob inapparent infizierte Schafe als Infektionsquelle in Betracht kommen, wurde schon in einer früheren Dissertation nachgegangen.¹³ Es wurden 104 Schlachtschafe aus einem Endemiegebiet und sieben kranke Schafe mit neurologischen Symptomen mittels RT-PCR auf BDV-RNA im Gehirn untersucht. Bei einem der kranken Schafe mit den typischen Symptomen einer BD konnte BDV-RNA im Gehirn nachgewiesen werden. Von den 104 untersuchten Schlachtschafen wies keines BDV-RNA auf, somit konnte kein inapparent infiziertes Tier darunter gefunden werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass trotz aufwändiger Untersuchungen es bisher nicht gelungen ist, die Infektionsquelle von BDV zu entdecken.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Schafe aus dem Endemiegebiet

Bestand 1

Dieser Bestand befindet sich in Malix im Kanton Graubünden, welches 1130 müM liegt. Es handelt sich um eine ältere Stallform mit ungefähr 50 Schafen. Die Fütterung erfolgt aus Trögen und vom Boden. Im Winter halten sich die Schafe im Stall auf, mit täglichem Auslauf, und im Sommer werden sie gealpt.

Am 28.10.2003 war im Bestand 1 ein adultes Schaf gestorben, bei welchem mittels Histologie und Immunhistologie eine Bornavirusinfektion diagnostiziert wurde. Um eine Übersicht über die Seroprävalenz im Bestand zu erhalten, wurden die restlichen Schafe vier Mal in einem Zeitraum von insgesamt 16 Monaten serologisch untersucht.

Bei der vierten Blutentnahme wurde zusätzlich EDTA-Blut, Nasensekret und Speichel entnommen und mit Real-Time RT-PCR analysiert. Die Proben wurden innert 2 h im Labor des Kantonalen Veterinäramtes in Chur weiterverarbeitet und die RNA extrahiert.

Am 17.05.2004 wurden zwei seropositive Schafe (Nr. 16 und Nr. 9g) aus dem Bestand 1 aufgekauft und nach Zürich transportiert. In Zürich wurden sie zusammen in den Instituts-eigenen Stallungen mit Stroheinstreu aufgestellt. Es wurde Heu und wenig Kraftfutter gefüttert, Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Über einen Zeitraum von fünf Wochen wurden diese zwei Schafe täglich untersucht und regelmässig beprobt. Es wurden insgesamt 14 Proben aus der Nasen- und Maulhöhle sowie 15 Blutproben entnommen und mittels Serologie und Real-Time RT-PCR untersucht. An den ersten zwei Tagen wurde zusätzlich ein Differential-Blutbild von je drei zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Blutproben angefertigt. Am 2.06.2004 wurde Liquor entnommen, die Tiere euthanasiert und seziert. Das Gehirn und zahlreiche innere Organe wurden histologisch, immunhistologisch und mittels Real-Time RT-PCR untersucht. Der Liquor wurde serologisch und mittels Real-Time RT-PCR untersucht.

Bestand 2

Dieser Bestand befindet sich in Felsberg (573 müM), ebenfalls im Kanton Graubünden und die Herdengrösse beträgt ungefähr 500 Schafe. Den Sommer verbringen diese Tiere auf einer Alp, im Winter befinden sie sich in einem Laufstall und auf einer Weide in Felsberg. Die Fütterung erfolgt aus am Boden stehenden Trögen und vom Boden.

Am 26.01.2005 wurde in diesem Bestand bei einem adulten, kranken Schaf eine Bornavirusinfektion entdeckt. Diese Diagnose wurde mittels Histologie, Immunhistologie und mit der Real-Time RT-PCR bestätigt.

Am 28.04.2005 wurde Blut von 60 der insgesamt 500 Tieren entnommen und serologisch untersucht. Die Auswahl der Schafe erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

5.1.2 Mäuse, Feld-, Waldspitzmäuse und Maulwürfe

Auf der Suche nach möglichen Vektoren für die BD wurden in den Endemiegebieten des Kanton Graubündens (Malix, Bonaduz, Chur und Jenaz) 167 Mäuse, vier Spitzmäuse und 22 Maulwürfe mittels Klappfalle gefangen und bei -20°C aufbewahrt (Abb. 3). Vier Mäuse aus dem Kanton Zürich dienten als Kontrolle. Die Tiere wurden mittels Klappfalle gefangen und bei -20°C aufbewahrt.

Nach Abtrennen des Kopfes wurde eine Hälfte des Kopfes in 4% Formalin fixiert. Das Gehirn wurde histologisch und immunhistologisch untersucht. Von der bei -20°C gelagerten zweiten Hälfte des Gehirnes wurden ca. $30\mu\text{g}$ entnommen und mittels Real-Time RT-PCR analysiert.



→ Abb. 3. Sammelorte der Mäuse, Spitzmäuse und Maulwürfe.

5.2 Methoden

5.2.1 Immunhistologie

Die Organe und Gehirnhälften wurden für mindestens zwei und maximal sieben Tage in einer 4 %-igen, gepufferten Formaldehydlösung belassen. Danach wurden bei den Gehirnen der Schafe 5-6 Schnittebenen und bei den Mäusen, Spitzmäusen und Maulwürfen mindestens zwei Schnittebenen hergestellt, welche auf positiv geladene Objektträger aufgezogen und bei 37°C über Nacht getrocknet wurden. Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (2×100%, 2×96%, 1×70% EtOH, 3×H₂O), danach 4 Minuten mit Hämalun gefärbt und 3 bis 5 Minuten mit Wasser gespült.

Die Schnitte wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit 0.05%-iger Pronaselösung (DAKO Cytomation, Copenhagen, Denmark, S2013) vorbehandelt. Die endogene Peroxidase wurde anschliessend mit H₂O₂ (3% in H₂O + 0.2% NaN₃) für 10 Minuten blockiert. Die Inkubation mit den primären monoklonalen Antikörpern gegen das Nukleoprotein p38/p40 (Verdünnung 1:500) bzw. gegen das Phosphoprotein p24 (Verdünnung 1:500) (Mouse-anti-BDV, L. Sitz, Tübingen) erfolgte über Nacht bei RT. Nach jedem Schritt wurde mit PBS (Phosphatpufferlösung, pH 8.0) gespült. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit-and anti-mouse-IgG, biotinyliert, ChemMate TM-Kit, DAKO Cytomation, Copenhagen, Denmark, K5003) für 15 Minuten bei RT. Anschliessend folgte die Behandlung mit Streptavidin-Peroxidase (ChemMateTM-KIT, DAKO Cytomation, Copenhagen, Denmark, K5003) während 15 Minuten bei RT und die Farbreaktion mit 3-amino-9-ethylcarbazol-Substrat (AEC-Substrate chromogen kit, Zymed, San Francisco, CA, USA, 00-2007). Schliesslich wurden die Schnitte mit Glycerin-Gelatine (Kaisers Glyzerin-gelatine, Merck, 1.09242) eingedeckt.

Als Positivkontrolle wurden bestätigte BDV-positive Gehirne mitgeführt, als Negativkontrolle Schnitte, welche anstelle des primären monoklonalen Antikörpers mit PBS inkubiert wurden.

5.2.2 Serologie

Der Nachweis von Serumantikörpern erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Es wurden Maskenobjektträger (Semadeni AG, Ostermundigen, Schweiz) mit 12 Feldern, Durchmesser 5 mm, für die Zellbeimpfung nach einem standardisierten Layout verwendet (Abb. 4).

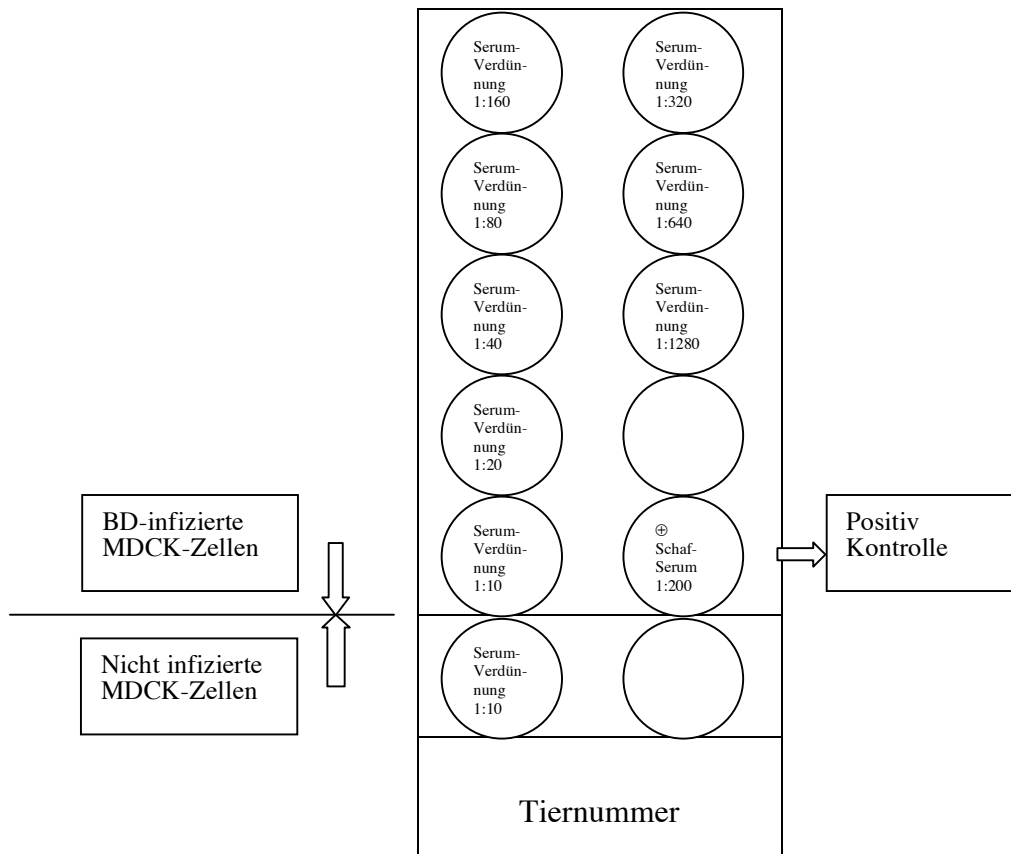


Abb. 4. Maskenobjektträger mit Darstellung der Serumverdünnungsreihe.
MDCK = Madin-Darby Canine Kidney Cells

Zwei Felder dieser Maskenobjektträger wurden mit nicht infizierten MDCK-Zellen und die restlichen 10 mit ca. 2'000 BDV-infizierten MDCK-Zellen beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. BDV-positive MDCK-Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. S. Herzog, Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität, Giessen, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

Der entstandene Monolayer wurde nach kurzem Spülen mit PBS während 30 Minuten bei RT getrocknet. Danach wurden die Maskenobjektträger in vorgekühltem Azeton (4°C) für 10 Minuten bei RT fixiert.

Auf die negativen Zellen und auf das erste Feld mit infizierten Zellen wurde eine Serumverdünnung von 1:10 aufgetragen, im weiteren je ein Feld mit den Verdünnungen 1:20,

1:40, 1:80, 1:160 und bei sehr hochtitrig positiven Seren bis 1:1280 versehen und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert (Abb. 4). Anschliessend wurde mit PBS (pH 8) gewaschen und mit dem sekundärem Antikörper (Alexa Fluor® 488 donkey anti-sheep IgG, 1:200) bei 37°C während 60 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Spülgang der Objektträger mit PBS, wurden diese mit Evans's blue (1:10'000 in PBS) kurz gegengefärbt und mit Glycerin/PBS (10:1) eingedeckt.

Als Positivkontrolle wurde ein hochtitriges Serum eines an BD erkrankten Schafes benutzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz pro Objekträger mit nicht BDV-infizierten Zellen und einer 1:10 Serumverdünnung.

Als positiv beurteilt wurden Proben mit intranukleäre fluoreszierende Einschlusskörperchen (Abb. 5). Jede Serie wurde von 2 verschiedenen Personen unabhängig voneinander beurteilt und verglichen.

5.2.3 Real-Time RT-PCR

Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden in Anlehnung an das von Schindler (2004)³⁴ erarbeitete Protokoll durchgeführt.

RNA-Extraktion

Für die RNA Extraktion aus Blut wurde das QIAamp® RNA Blood Mini Kit (QIAGEN AG Basel, Schweiz) und für Nasensekret-und Speicheltupfer das QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN AG Basel, Schweiz) gemäss den Protokollen des Herstellers verwendet.

Die RNA aus MDCK-Zellen (Positivkontrolle) wurde mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN AG Basel, Schweiz) extrahiert.

Die RNA Extraktion aus Gehirn- und Herzgewebe der Spitzmäuse erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN AG Basel, Schweiz), zusätzlich wurden zur Homogenisierung des Gewebes QIAshredder spin columns eingesetzt.

Überführung von RNA in cDNA

Um vorhandene DNA zu eliminieren, wurde die RNA mit 1µl RNase-free DNase (Promega, Dübendorf, Schweiz) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer Enzyminaktivierung bei 95°C für 5 Minuten.

Anschliessend erfolgte die Überführung der RNA in cDNA mittels dem Reverse Transcription System (Catalys AG, Promega, Wallisellen, Schweiz) für 60 Minuten bei 42°C. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde durch Erhitzung auf 95°C für 5 Minuten erreicht.

Die erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert.

Primer für die Real Time RT-PCR (TaqMan®)

Es wurde das ABI 7700 real-time Sequence Detection System (Applied Biosystems, Rotkreuz, Schweiz) für die Amplifikation und Quantifikation verwendet.

Folgende Primer und Sonden wurden für die Amplifikation eingesetzt.

p40 Forward: 5' GGTTTAAACTATGATGGCAGCCTTA 3'

p40 Reverse: 5' GTGGATTAAACATCTGGAGTAGTGTAGC 3'

p40 Sonde: 5' ACCGGCCATCCCATGGTGAGAC 3'

p24 Forward: 5' TCCCTGGAGGACGAAGAAGAT 3'

p24 Reverse: 5' CTTCCGTGGTCTTGGTGACC 3'

p24 Sonde: 5' CCAGACACTACGACGGGAACGA 3'

Die Sonde wurde am 5'-Ende mit dem Reporter FAM (6-Carboxyfluorescein) und am 3'-Ende mit dem Quencher TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine) markiert.

Die Amplifikate der p40 Primer ergaben Produkte mit der Länge von 78bp und diejenigen der p24 Primer solche von 69bp. Die verwendeten Primer und Sonden wurden von Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland hergestellt.

Um bei der Amplifikation eine endogene Kontrolle über die Qualität der extrahierten RNA zu erhalten, wurde eukaryotische 18s ribosomale RNA verwendet. Die Sonde wurde markiert mit VICTM dye-MGB (Applied Biosystems Basel, Rotkreuz, Schweiz).

Als Positiv- bzw Negativkontrolle wurde cDNA von BDV-infizierten MDCK Zellen, bzw. RNase free water eingesetzt (Applied Biosystems Basel, Rotkreuz, Schweiz).

Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: Verwendet wurde ein Reaktionsvolumen von 25 μl pro Delle während der Amplifikation. Dieses bestand aus 12.5 μl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA), 3 μl der 80nM (p40-56T) bzw. der 160 nM (p24-54T) Sonden, 3 μl der 600 nM Primer und 3.5 μl von der zu amplifizierenden cDNA.

Bei der 18s rRNA wurden 7.7 μl RNase free water mit 12.5 μl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) und 1.25 μl Primer/Probe (Applied Biosystems Basel, Rotkreuz, Schweiz) zusammengemischt.

Begonnen wurde die Reaktion mit 2 Minuten bei 50°C, um die Uracil-N-Glycosilase zu aktivieren, welche die allfällig bereits vorhandenen PCR-Produkte zerstörte. Die Deaktivierung erfolgte während 10 Minuten bei 95°C. Diese Reaktionsbedingung aktiviert gleichzeitig die TaqPolymerase. Es folgten 40 Zyklen mit der Denaturierung bei 95°C für 15 sec, bei 60°C für 1 Minute erfolgte die spezifische Bindung der Primer und die nachfolgende Anlagerung der Nukleotide durch die TaqPolymerase.

Als positive Resultate wurden Ct-Werte unter 40.00 gewertet.

Prinzip der Real-Time RT-PCR

Der ABI Prism 7700 misst kontinuierlich die Akummulation der PCR Produkte, dazu wird eine zweifach farbig markierte fluoreszierende Oligonukleotidsonde verwendet. Diese bestand in unserem Fall aus 20-25 Basen und war am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencherfarbstoff 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine (TAMRA) versehen. Die Oligonukleotidsequenz der Sonde ist identisch mit einer Sequenz in dem betreffenden Zielgebiet. Solange die Probe unversehrt ist, unterdrückt die Fluoreszenz des Quenchers diejenige des Reporters. In der Verlängerungsphase der PCR wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der TaqPolymerase in kleinere Stücke geteilt und gibt somit den Reporter von der Probe frei. Dadurch verliert der Quencher seine unterdrückende Wirkung und es erfolgt ein Anstieg der Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes (FAM) und ein Absinken des Quencherfarbstoffes (TAMRA). Im Falle einer positiven Probe nimmt während der gesamten Amplifikation die Fluoreszenz des Reporters exponentiell zu, diese Zunahme ist direkt proportional zu der Menge produzierter PCR-Produkte und dadurch zur anfänglich

vorhandenen Menge der gesuchten DNA-Sequenz. Der ABI Prism 7700 misst die Fluoreszenz mittels eines Spektralphotometers.

Die Ergebnisse werden auf zwei verschiedene Wege sichtbar gemacht. Zum einen im Amplification plot, welcher die Entwicklung der Fluoreszenzzunahme der Proben während der Amplifikation darstellt. Die Schnittstelle zwischen Amplification plot und Threshold wird als Cycle threshold oder CT bezeichnet. Der Threshold ist definiert als die 10 fache Standardabweichung von der Hintergrundfluoreszenzintensität, die in unserem Fall zwischen dem 3. und 15. Cycle gemessen wurde. Ein positives Resultat wird somit daran erkannt, dass die Fluoreszenzintensität (Zunahme der Fluoreszenz ΔR) mehr als 10 mal die Standardabweichung der Grundfluoreszenz (Threshold cycle (CT)) beträgt.

Als zweite Darstellungsform wird die Multicomponent angewendet. Darin wird die Fluoreszenzzunahme und -abnahme des Reporters (FAM) und des Quencher (TAMRA) dargestellt. Bei einem positiven Resultat nimmt die Fluoreszenz des Quenchers ab und die des Reporters zu, daraus erfolgt eine Schnittstelle der beiden Kurven.

Quantifizierung

Um die erhaltenen Resultate quantifizieren zu können, wurden wie in der Dissertation Schindler (2004)³⁴ Verdünnungsreihen durchgeführt.

Mittels Umrechnung der erhaltenen Ct-Werte in normalisierte Werte und der anschliessenden Division des Mittelwertes der doppelt angesetzten Probe durch den normalisierten Wert der entsprechenden 18s rRNA erhält man die relative BD Viruskopienzahl.

Normalisierte Werte:

p40 $((y-41.411)/-3.3317) \text{ inv log}$

p24 $((y-41.369)/-3.1796) \text{ inv log}$

18s RNA $((y-31.063)/-3.1775) \text{ inv log}$

Kalibrierter Wert:

Normalisierte Werte $\text{Ct-Wert 1} + \text{Ct-Wert 2} / \text{normalisierter Wert der zugehörigen 18s RNA}$

6 Resultate

6.1 Bestand 1

6.1.1 Bestandesuntersuchung Serologie

Die Antikörpertiter der Schafe im Bestand 1 bewegten sich zwischen 1:10 und 1:160 (Tab. 1a und 1b). Bei der Blutentnahme, die am 11.12.2003 erfolgte, erwiesen sich 18 von 43 Schafen (41.86%) als serologisch positiv. Am 18.03.2004 konnten 17 von 43 Schafen (39.53%) mit Antikörpertitern ermittelt werden. Davon waren 6 Tiere neu seropositiv, und deren 8 waren neu seronegativ.

Die dritte Untersuchung fand am 11.11.2004 statt, hierbei waren 34 von 49 Schafen (69.38%) seropositiv. 15 Schafe serokonvertierten von negativ zu positiv und ein Schaf war neu seronegativ.

Die vierte und letzte Bestandesuntersuchung erfolgte am 28.04.2005. 39 von 46 Blutproben (84.78%) enthielten Antikörper gegen das Bornavirus. Acht Schafe hatten serokonvertiert, ein Schaf wurde neu seronegativ.

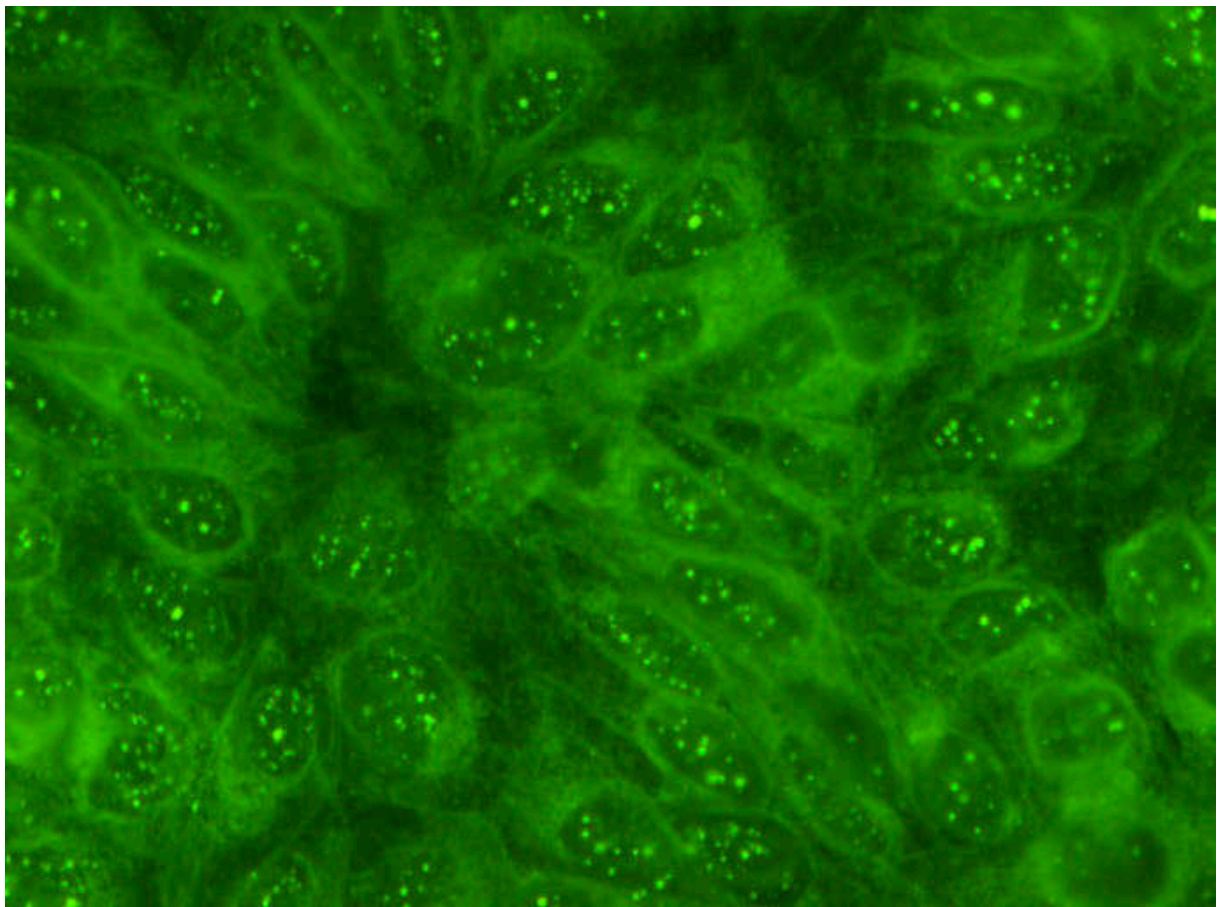


Abb. 5. Indirekte Immunfluoreszenz. BDV-infizierte MDCK-Zellen mit einer Serumverdünnung von 1:40 des Schafes Nr. 5865 aus dem Bestand 1. 40-fache Vergrößerung.

Entnahmedatum	Anzahl untersuchte Schafe	Anzahl positive Schafe ($\geq 1:10$)	Anzahl negative Schafe	Seroprävalenz (%)
11.12.2003	43	18	25	41.86
18.03.2004	43	17	26	39.53
11.11.2004	48	33	15	68.75
28.04.2005	46	39	7	84.78

Tab. 1a. Durchschnittliche Seroprävalenz aller untersuchter Schafe zu 4 verschiedenen Entnahmezeitpunkten ($\geq 1:10$).

Schaf-Nr	11.12.2003	18.03.2004	11.11.2004	28.04.2005
2	Negativ	1:20	1:20	1:40
5	1:20-1:40	Negativ	1:40-1:80	1:20
7	Negativ	Negativ	Negativ	1:80
10	1:10	1:10	1:20-1:40	1:20
10g	1:40	1:20	1:20-1:40	1:160
11	Negativ	Negativ	1:80	1:40
13	1:20	Negativ	1:80	1:80
14	Negativ	1:10	1:10-1:20	1:40
15	Negativ	Negativ	1:20	1:40
400	Negativ	Negativ	Negativ	1:20
837	1:40	1:40-1:80	1:80	1:80
840	Negativ	Negativ	1:10-1:20	1:160
878	Negativ	Negativ	1:20	1:40
885	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
5842	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
5861	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
5865	1:80	1:80-1:160	1:20-1:40	1:80
5866	1:20	Negativ	1:20-1:40	1:40
6887	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ
6894	1:160	1:160	1:80	1:160
6896	Negativ	Negativ	Negativ	1:20
6899	1:20	Negativ	1:20	1:20
6911	Negativ	Negativ	1:20-1:40	1:40
6921	1:40	Negativ	Negativ	1:40
6925	Negativ	Negativ	Negativ	1:40
6934	1:20	1:20	1:20	1:40
6940	Negativ	Negativ	1:40	1:20
6972	1:80-1:160	Negativ	1:20	1:40
6976	Negativ	Negativ	1:10-1:20	1:40
6978	Negativ	Negativ	1:10-1:20	1:10
9g	1:40-1:80	1:20-1:40	*	*
16	1:160	1:160	*	*
6	*	1:10-1:20	*	*
8	*	Negativ	1:80	1:40
9	Negativ	*	*	*
389	Negativ	1:10-1:20	Negativ	*
884		1:20	*	*

891	*	1:20	1:10-1:20	1:80
991	Negativ	*	*	*
5390	Negativ	1:20	*	*
5923	*	*	*	Negativ
6893	1:80	Negativ	*	*
6902	1:10	1:10-1:20	*	*
6943	1:40	*	1:20	1:40
6951	Negativ	1:10-1:20	1:10-1:20	*
6979	*	Negativ	1:20	1:40
6985	1:40	Negativ	*	*
6997	Negativ	*	*	*
5888	*	*	1:20	1:80
5889	*	*	Negativ	1:40
5895	*	*	Negativ	*
5897	*	*	1:10-1:20	1:40
5900	*	*	1:10-1:20	1:10
5901	*	*	1:20-1:40	1:10
5902	*	*	Negativ	1:40
5903	*	*	Negativ	1:80
5905	*	*	1:40	*
5911	*	*	Negativ	Negativ
5912	*	*	1:10-1:20	1:20
5913	*	*	1:10	Negativ
2361	*	*	1:10-1:20	1:40

Farbencode:

Immer positiv
Mindestens 1 mal positiv
Immer negativ

Tab. 1b. Übersicht über die Serumantikörpertiter aller Schafe im Bestand 1.

* = nicht vorhanden

6.1.2 Real-Time RT-PCR

Die Resultate der anlässlich der serologischen Untersuchungen vom 11.11.2004 erhobenen Proben von Blut, Nasensekret und Speichel sind in Tabelle 2 und Tabelle C im Anhang aufgelistet.

Blut

Die Blutuntersuchung ergab bei der vierfach angesetzten Probe bei drei Schafen mit den p24 Primer und bei zwei Schafen mit den p40 Primer, je ein schwach positives Resultat (Tab. 2).

Schaf	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
2	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 35.21	2.6949909 85.503983	44.599487	0.0013538
	18sr RNA	25.22	69.002851		
840	p40	40.00 38.25	2.651597 8.8871988	5.7693979	0.6463427
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	19.53	4'261.7013		
6887	p40	40.00 35.16	2.651597 75.200261	38.925929	0.0064039
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	19.04	6'078.4422		
6976	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 32.74	2.6949909 520.1994	261.4472	0.0009719
	18sr RNA	13.81	268'992.62		
6978	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 32.40	2.6949909 661.9041	332.29954	0.0075609
	18sr RNA	16.31	43'949.941		

Tab. 2. Positive Ergebnisse der real-time RT-PCR in Blutproben von Schafen des Bestandes 1. Umrechnung der Cycle-Werte in die relative Viruskopienzahl.
n.d. = not done

Speichel

Alle untersuchten Speichelproben ergaben negative Resultate (siehe Anhang Tab. C).

Nasensekret

In 13 Proben waren keine Zellen vorhanden, somit konnte keine Aussage über diese Proben gemacht werden.

Die restlichen untersuchten Nasensekretproben waren in allen vier Ansätzen negativ (siehe Anhang Tab. C).

6.2 Verlaufsuntersuchung an zwei Schafen aus dem Bestand 1

6.2.1 Serologie

Schaf Nr. 16

Das Schaf Nr. 16 war in den ersten zwei serologischen Bestandesuntersuchungen mit einem Antikörpertiter von durchschnittlich 1:160 hochtitrig positiv (Tab.1b).

Während der Untersuchungsdauer verlief der Serumantikörpertiter zwischen 1:80 und 1:320 (Tab. 3). Der Verlauf zeigte zwei deutliche Peaks, und zwar am 2.6. und 7.6.2004.

Ebenfalls serologisch untersucht wurde der Liquor. Dieser wies einen Antikörpertiter von 1:40 auf.

Am 19.03.2004 wurde im Differential-Blutbild eine massive Leukozytose festgestellt. Diese wurde durch die Erhöhung der Neutrophilenzahl verursacht (siehe Anhang Tab. A).

Schaf Nr. 9g

Das zweite Schaf wurde in den vorangegangenen serologischen Untersuchungen zweimal positiv getestet. Die Antikörpertiter betrugen 1:80 und 1:40 (Tab. 1b).

Im Verlauf der Untersuchung konnte ein einmaliger Anstieg der Serumantikörper am 21.05.2004 festgestellt werden. Dieser hielt über 3 Tage hinweg an. Danach sank der Antikörpertiter mehrheitlich konstant gegen null (Tab. 3).

Im Liquor konnten keine Antikörper nachgewiesen werden

Entnahmedatum	Schaf Nr. 16	Schaf Nr. 9g
17.05.04; 10.30 Uhr	1:80	1:80
17.05.04; 15.00 Uhr	1:160	1:80
19.5.2004	1:320	1:80
21.5.2004	1:320	1:160
24.5.2004	1:160	1:160
26.5.2004	1:80	1:160
28.5.2004	1:80	1:40
31.5.2004	1:160	1:80
2.6.2004	1:320	1:40
4.6.2004	1:160	1:40
7.6.2004	1:320	1:10
9.6.2004	1:160	Negativ
14.6.2004	1:160	1:20
22.6.2004	1:160	1:10

Tab. 3. Serumantikörperverlauf der zwei Schafe Nr. 16 und 9g.

6.2.2 Real-Time RT-PCR

Schaf Nr. 16

Das Blut ergab am 19.5. und 21.05.2004 je ein zweifach positives Ergebnis mit dem Primer p24 (Tab. 4). Im Speichel fand man am 17.05.2004 um 15.00 Uhr mit p40 und am 19.05.2004 mit p24 je ein einfaches, und am 24.05.2004 mit p24 ein doppelt positives Resultat (Tab. 5). Im Nasensekret wurde an den Daten 19., 21. und 28.05.2004 mit p24 und am 24.05.04 mit p40 jeweils ein einfach positives Resultat gemessen (Tab. 6).

Urin, Galle und Liquor waren in allen vier Ansätzen negativ, ebenso die nicht in Tabelle 4, 5 und 6 aufgeführten Resultate der Blut-, Nasensekret- und Speichel-Analyse (siehe Anhang Tab. D, E, F).

Datum Material	Primer	Cycle-Threshold- Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
19.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	37.25 35.64	19.744492 63.357637	41.551064	0.00005
	18sr RNA	12.24	839'149.8		
21.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	34.02 36.38	204.78447 37.073645	120.92906	0.000142
	18sr RNA	12.22	851'400.21		

Tab. 4. Berechnung der relativen Viruskopienzahlen in den positiven Blutproben von Schaf Nr.16.

Datum Material	Primer	Cycle-Threshold- Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
17.05.04 15.00 Uhr	p40	40.00 36.12	2.651597 38.732434	20.692166	3.7608558
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	28.71	5.5019834		
19.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	36.93 36.47	24.893591 34.734403	29.813997	1.0014287
	18sr RNA	26.38	29.771462		
24.05.05	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 38.76	2.6949909 6.6152074	4.6550991	44.878244
	18sr RNA	34.19	0.1037273		

Tab. 5. Berechnung der relativen Viruskopienzahlen in den positiven Speichelproben von Schaf Nr. 16.

Datum Material	Primer	Cycle-Threshold- Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
19.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	37.71 40.00	14.150562 2.6949909	8.4227764	0.1087012
	18sr RNA	25.06	77.485615		
21.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 36.66	2.6949909 30.269406	16.482198	2.4455484
	18sr RNA	23.43	6.7396736		
24.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	36.38 40.00	37.073645 2.6949909	19.884318	243.48552
	18sr RNA	34.52	0.0816653		
28.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 36.72	2.6949909 28.98235	15.838671	504.77959
	18sr RNA	35.84	0.0313774		

Tab. 6. Berechnung der relativen Viruskopienzahl der positiven Nasensekretproben von Schaf Nr. 16.

Schaf Nr. 9g

Im Blut des Schafes Nr. 9g wurde am 17.05.2004, kurz vor dem Beginn des Transportes um 10.30 Uhr ein einfach positives Resultat mit den p24 Primern festgestellt. Der Speichel war doppelt positiv mit den p24 Primern am 21.05.2004 (Tab. 7). Das Nasensekret war bei allen Untersuchungen negativ.

Ebenfalls negativ verlief die Untersuchung von Liquor und Galle, sowie die nicht in Tabelle 7 aufgeführten Analysen von Blut, Nasensekret und Speichel (siehe Anhang Tab. G, H, I).

Datum Material	Primer	Cycle- Threshold- Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
17.05.04 10.30 Uhr Blut	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 37.05	2.6949909 22.821646	12.758318	0.0000028
	18sr RNA	9.90	4'573'698.2		
21.05.04 Speichel	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	33.51 32.93	296.27469 450.92824	373.60147	9'239.3736
	18sr RNA	35.49	0.0404358		

Tab. 7. Berechnung der relativen Viruskopienzahlen in den positiven Blut- und Speichelproben von Schaf Nr. 9g.

6.2.3 Sektion

Die Sektion der beiden Schafe und die histologischen Untersuchungen der Hauptorgane ergaben keine Hinweise auf signifikante Veränderungen.

Bei Schaf Nr. 16 wurden mittels Real-Time RT-PCR, Histologie und Immunhistologie die Gehirnlokalisationen kranio-ventraler Kortex, Ammonshorn, Kleinhirn, Trigemininalganglion und Medulla oblongata und diverse Organe wie zum Beispiel Niere, Blase, Herz und Knochenmark untersucht. Alle Analysen verliefen negativ.

Bei Schaf Nr. 9g wurden histologisch und immunhistologisch dieselben Organe untersucht. Mittels Real-Time RT-PCR wurden 3 Gehirnlokalisationen analysiert. Alle Proben ergaben ebenfalls negative Resultate (siehe Anhang Tab. J, K).

6.3 Bestand 2

6.3.1 Histologie und Immunhistologie

Am 26.01.2005 wurde bei einem adulten, weissen Alpenschaf histologisch eine hochgradige, diffuse nicht-eitrige Meningoenzephalitis mit intranukleären Einschlusskörperchen in den Neuronen im Bereich des Ammonshorns diagnostiziert (Abb. 6).

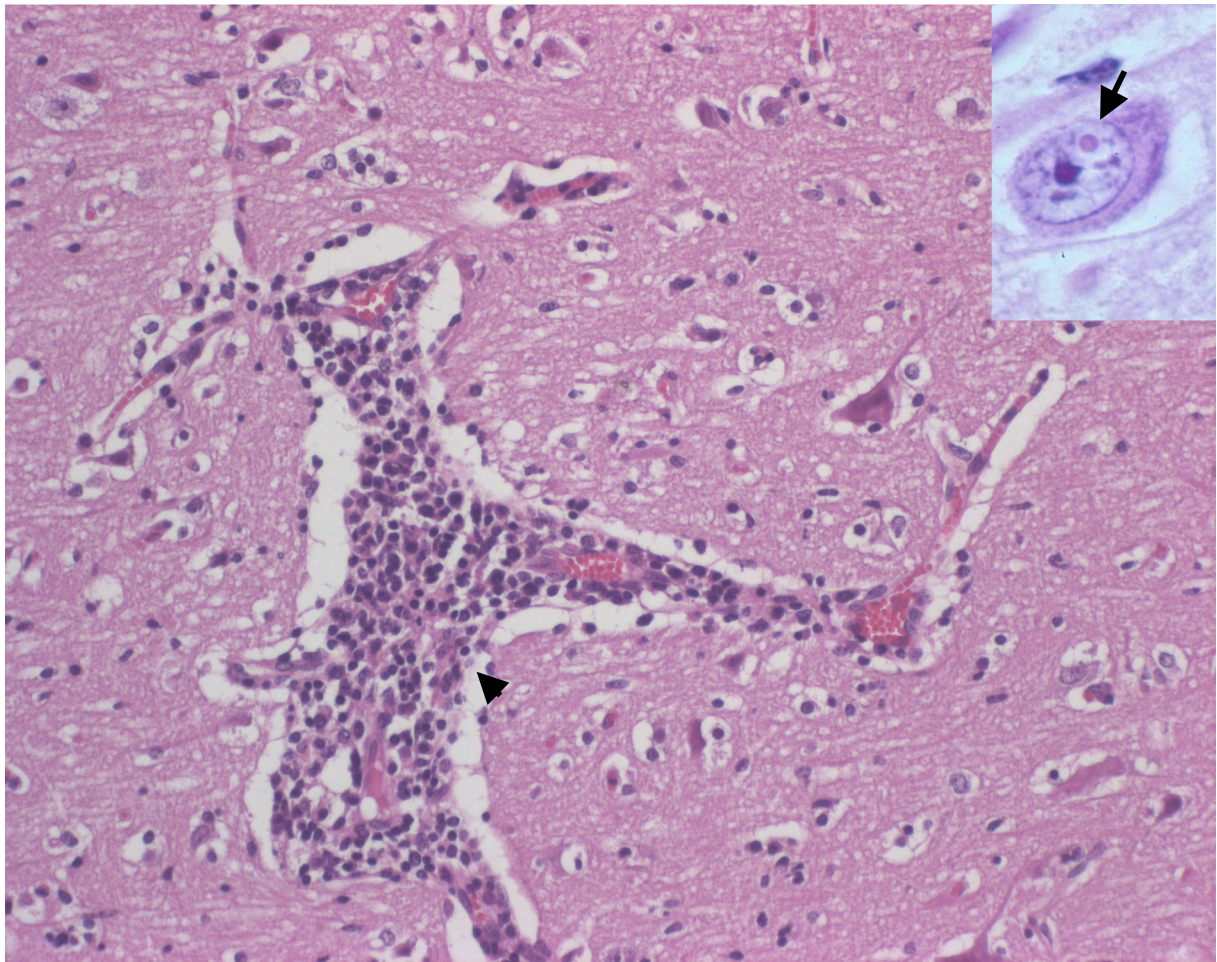


Abb. 6. HE, adultes Schaf, Kortex. Hochgradige perivaskuläre Infiltration mit mononukleären Entzündungszellen (Pfeilspitze). 40×. HE, Ammonshorn, eosinophile Joest-Degen Einschlusskörperchen (Pfeil). 100×.
HE = Hematoxylin-Eosin.

Immunhistologisch reagierten Neuronen und Gliazellen im Gehirn positiv mit den monoklonalen Antikörpern gegen das Phosphoprotein p24 und das Nukleoprotein p38/p40 (Abb. 7, Tab. 8).

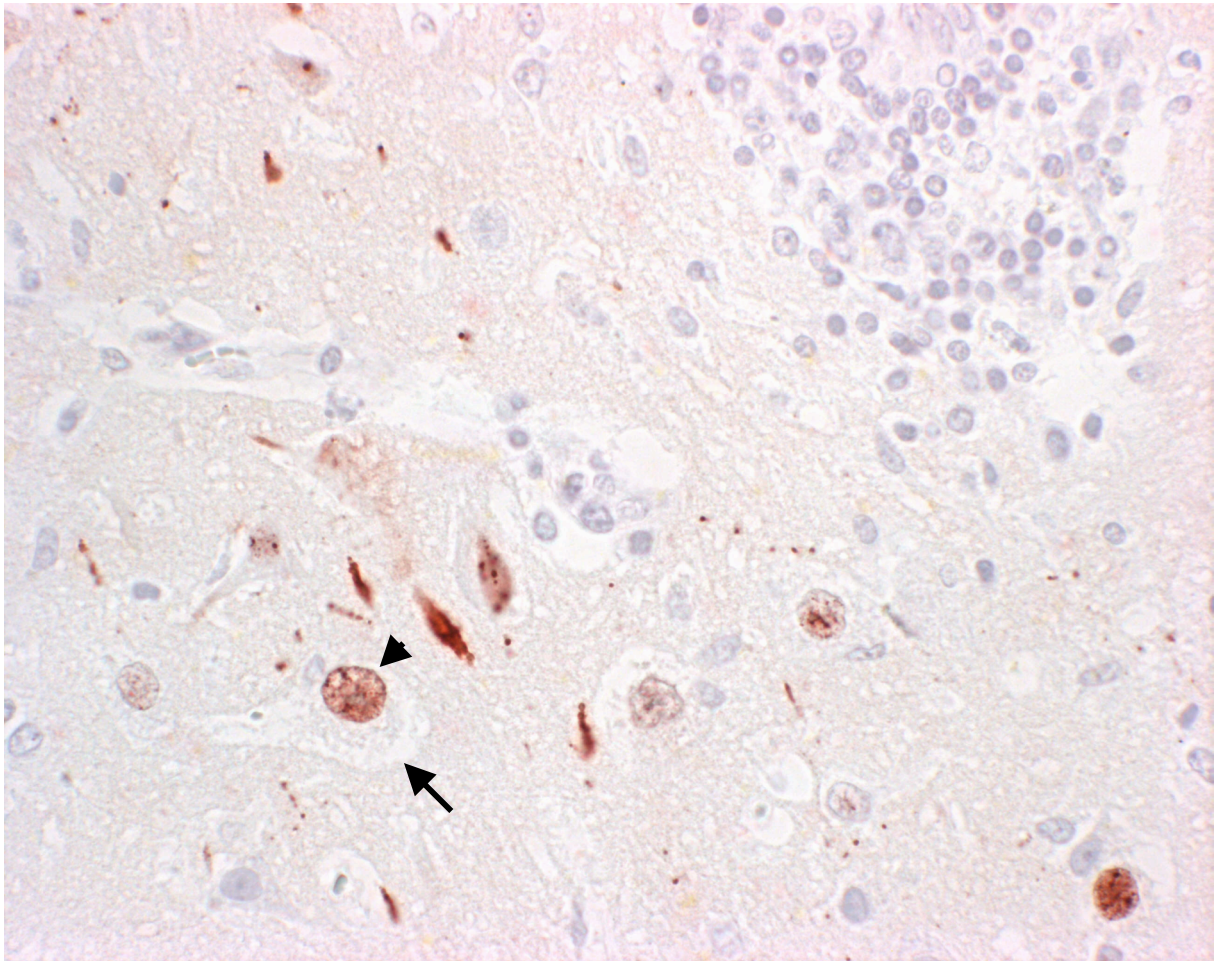


Abb. 7. IHC, Ammonshorn, adultes Schaf. Die Neuronen (Pfeil) weisen eine homogene bis granuläre intranukleäre Färbung auf (Pfeilspitze). Nervenfasern reagieren auch positiv. Intranukleäre Einschlusskörperchen (Joest-Degen) sind ebenfalls sichtbar. 40x.

6.3.2 Real-Time RT-PCR

Die Untersuchung mittels Real-Time RT-PCR fiel an den drei Lokalisationen kranio-ventraler Kortex, Ammonshorn und Kleinhirn mit den Primern p40 mittelgradig und mit den Primern p24 stark positiv aus. Die Werte für die relative BDV Kopienzahl bewegten sich für p40 zwischen 0.81165 und 2.8669794 und für p24 zwischen 65.937085 und 101.02323 (Tab. 8).

Material	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)	IHC	
						AK	Resultat
Kortex	p40	24.56	114'229.51	87'990.499	1.0130886	p38	+++
		25.45	61'751.487				
	p24	19.48	7'659'479.7	5'726'880.20	65.937085	p24	+++
		20.45	3'794'280.6				
	18srRNA	15.37	86'853.706				
Ammons-horn	p40	19.09	5'07'060	4'823'789.8	2.8669794	p38	+++
		19.20	4'640'519.7				
	p24	15.17	173'670'000	169'975'000	101.02323	p24	+++
		15.23	166'280'000				
	18srRNA	11.28	1'682'533.8				
Kleinhirn	p40	20.98	1'356'140.9	1'864'915.4	0.81165	p38	+++
		20.17	2'373'689.8				
	p24	15.32	155'790'000	159'250'000	69.308918	p24	++
		15.26	162'710'000				
	18srRNA	10.85	2'297'684.1				

Tab. 8. Berechnung der relativen Viruskopienzahlen und die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen.

+ schwach positives Resultat
 ++ mittelgradig positives Resultat
 +++ stark positives Resultat

6.3.3 Bestandesuntersuchung Serologie

Am 28.04.2005 wurde von 60 der insgesamt ca. 500 Schafe des Bestandes 2 Blut entnommen. Die serologische Untersuchung ergab, dass bei 34 Seren Antikörper vorhanden waren (56.7 %). Es wurde jede Serumprobe vierfach angesetzt und der Durchschnitt berechnet. Die Titer lagen sich zwischen 1:10 und 1:160 (Tab. 9).

Schaf-Nummer	Antikörpertiter	Schaf-Nummer	Antikörpertiter
5	1:20	142	1:20
6	1:80	144	Negativ
10	Negativ	628	1:20
21	1:40	631	Negativ
26	1:20	694	1:20
38	1:10	874	1:160
41	1:40	1340	1:40
42	Negativ	1715	Negativ
45	Negativ	3805	1:10
46	1:20	4611	1:20
47	1:20	4635	Negativ
48	Negativ	4755	Negativ
53	1:20	4756	1:20
52	Negativ	4758	1:20
54	1:10	4764	1:20
55	1:40	4765	Negativ
59	Negativ	6852	1:10
61	Negativ	7080	Negativ
62	Negativ	7216	1:10
63	Negativ	7220	1:10
65	Negativ	7223	1:10
66	1:10	7228	Negativ
70	1:20	7229	Negativ
76	1:10	7252	Negativ
77	1:40	7885	1:10
80	1:10	8913	Negativ
97	Negativ	1026-6089	Negativ
103	Negativ	1235-4770	Negativ
138	1:20	Bienli	Negativ
141	1:20	Glöckli	1:20

Tab. 9. Übersicht über die Serumantikörpertiter des Bestandes 2.

6.4 Mäuse, Spitzmäuse und Maulwürfe

Insgesamt untersucht wurden 167 Mäuse verschiedener Arten, drei Feldspitzmäuse, eine Waldspitzmaus und 22 Maulwürfe, welche im Laufe von acht Jahren von mehreren Tierbesitzern im Endemiegebiet in Fallen gefangen und getötet worden waren (siehe Anhang Tab. L).

6.4.1 Histologie und Immunhistologie

Histologisch konnten bei keinem der 193 Gehirne BD-verdächtige Veränderungen festgestellt werden.

Die immunhistologische Untersuchung der Gehirne ergab in drei Fällen ein positives Resultat, bei denen mit den Antikörpern p24 und p38/40 Virusantigen in Nerven- und Gliazellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 8). Es handelte sich um die drei Feldspitzmäuse. Die restlichen 190 Gehirne waren eindeutig negativ.

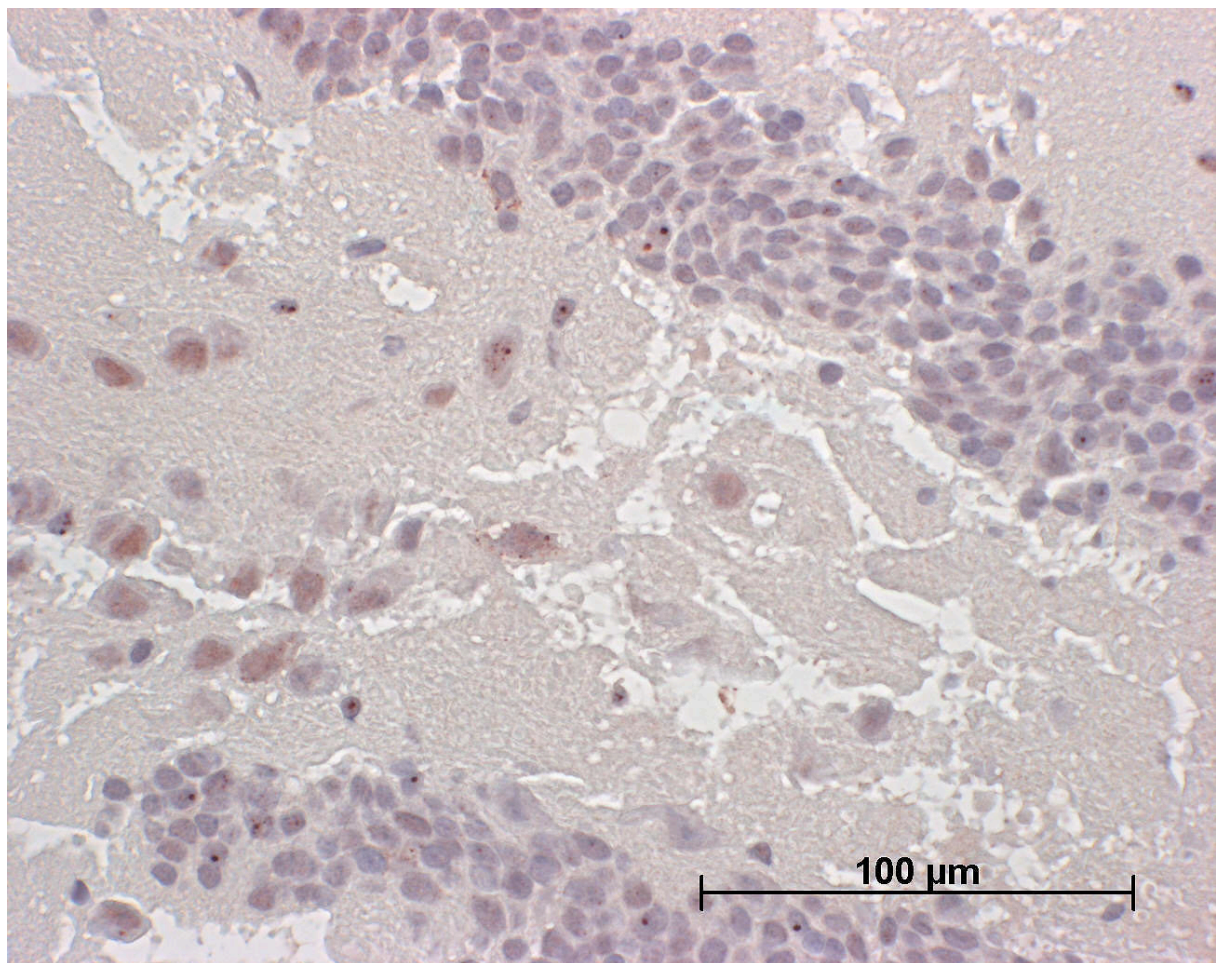


Abb. 8. IHC, Gehirn, Feldspitzmaus Nr. 137, in den Neuronen homogene bis granuläre intranukleäre Färbung sichtbar. Ebenfalls sichtbar sind die intranukleären Einschlusskörperchen (Joest-Degen). 40 x.

Von den drei Feldspitzmäusen wurde nachträglich das Myokard untersucht. Bei einem Tier zeigte sich auch in den Herzmuskelzellen immunhistologisch multifokal verteilt Virusantigen (Abb. 9).

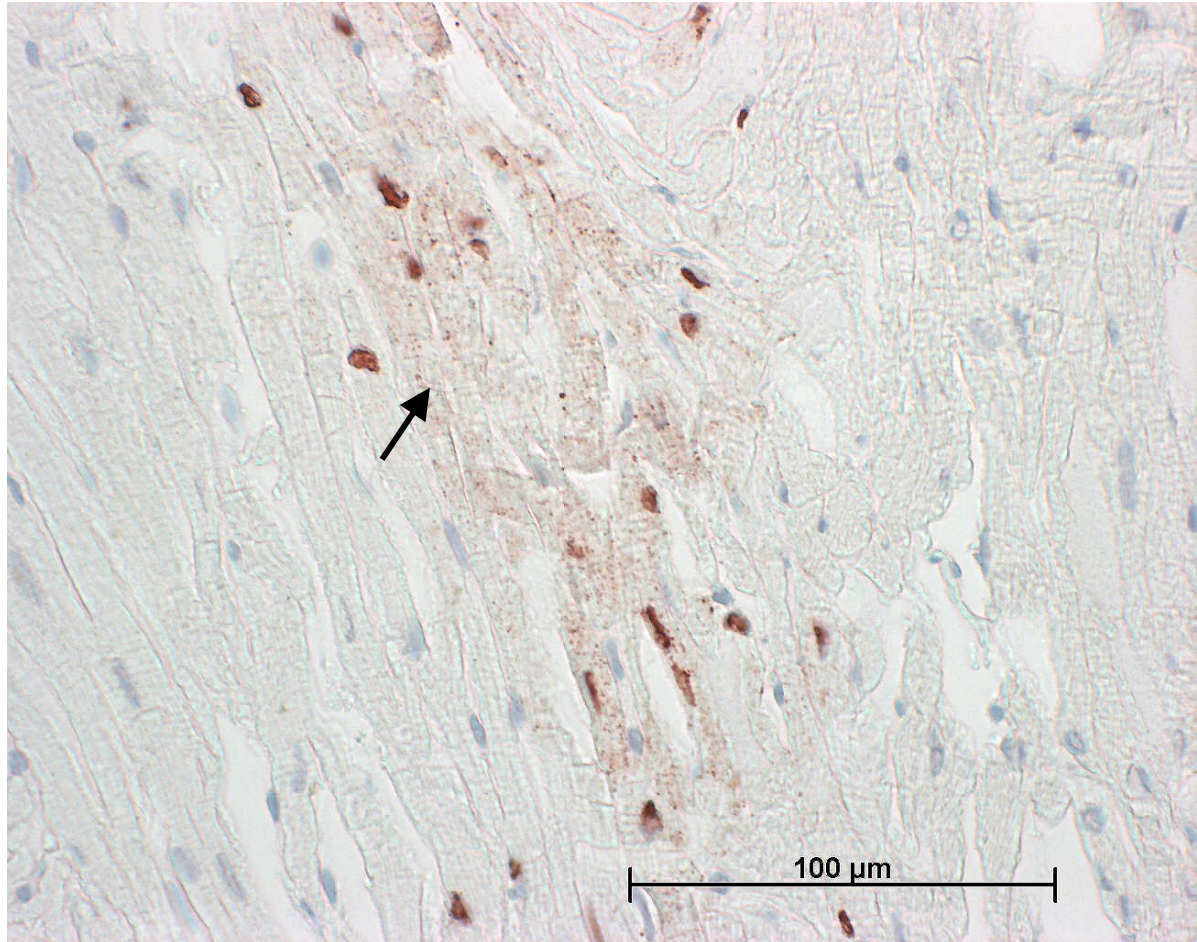


Abb. 9. IHC, Myokard, Feldspitzmaus Nr 144. Diffuse Rotfärbung des Zytoplasmas und des Zellkerne (Pfeil). 40 x.

6.4.2 Real-Time RT-PCR

Die Untersuchung mittels Real-Time RT-PCR bestätigte die immunhistologischen Resultate. Jedes der drei positiven Gehirne beinhaltete eine sehr grosse Menge von BDV-RNA (Tab. 10). Bei der Untersuchung des Myokards konnte bei allen drei Tieren BDV-RNA detektiert werden, jedoch war die relative Viruskopienzahl weit geringer. Bei Tier Nr. 137 war die Herzmaterialmenge anstatt 30 μ g lediglich 10 μ g (Tab. 11).

Tier-Nummer	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
134	p40	16.01 15.74	42'076'129 50'707'884	46'392'006	23.509453
	p24	14.79 15.07	228'680'000 186'710'000	207'695'000	105.2508
	18sr RNA	11.06	1'973'334.1		
137	p40	26.00 25.00	42'224.696 84'277.879	63'251.288	4'417.0181
	p24	25.06 22.95	134'667.11 620'678.97	377'673.04	26'373.987
	18sr RNA	27.39	14.319907		
144	p40	17.06 17.12	20'364'856 19'537'659	19'951'258	55.910313
	p24	16.27 16.27	78'299'722 78'299'722	78'299'722	19.42285
	18sr RNA	13.42	356'843.97		
186	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	26.28	32.008951		
187	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	32.31	0.4050915		

Tab. 10. Resultate der Gehirnuntersuchung der 3 Feldspitzmäuse und 2 negativen Mäusen.

Tier-Nummer	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
134	p40	27.67 28.21	13'314.38 9'167.30	11'270.80	2.84
	p24	27.52 28.62	22'676.67 10'224.07	16'450.37	4.15
	18s rRNA	19.63	3'963.80		
137	p40	33.73 33.96	202.036 172.344	187.18	0.0154
	p24	33.11 34.66	395.82 128.83	262.32	0.022
	18s rRNA	18.08	1'2187.56		
144	p40	31.47 31.90	963.3 715.65	839.47	1.23
	p24	32.02 32.63	871.58 560.35	715.97	1.051
	18s rRNA	22.06	681.33		
186	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18s rRNA	15.74	65'947.37		
187	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18s rRNA	12.67	614'487.4		

Tab. 11. Resultate der Herzuntersuchung der 3 Feldspitzmäuse und 2 negativen Mäusen.

6.4.3 Sequenzierung

Um eine allfällige Kontamination mit dem verwendeten Laborstamm (MDCK infizierte Zellen: Pferd H1766) ausschliessen zu können, wurde das Hirnmaterial an der veterinärmedizinischen Universität Wien im klinischen Departement für bildgebende Diagnostik, Infektions- und Laboratoriumsmedizin sequenziert.

Die Sequenz des BDV-Stammes aus der Spitzmaus (hinterlegt in der GenBank mit der Zugangsnummer DQ251041) stimmte zu 99.9% überein mit jener eines BDV-Stammes aus einem an BD erkrankten Pferd (Zugangsnummer DQ251042), welches sehr nahe bei dem Fangort der Spitzmäuse gelebt hatte. Eine ähnlich grosse Übereinstimmung fand man ausserdem zur Sequenz eines BDV-Stammes von einem zweiten an BD erkrankten Pferd aus derselben Region, weshalb auf eine gemeinsame Herkunft der Virusstämme geschlossen werden kann. Eine Kontamination im Labor hingegen kann ausgeschlossen werden.

7 Diskussion

Das eine Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob in Sekreten von gesunden Schafen aus Schafbeständen mit kürzlich festgestellten BD Fällen Virus-RNA vorhanden ist und dadurch ausgeschieden wird. Zu diesem Zweck wurden Nasen- und Maulhöhlentupfer sowie Blut von 50 Schafen aus dem Bestand 1 entnommen und mittels Real-Time RT-PCR untersucht. In diesem Bestand wurde in wiederholten Untersuchungen über 16 Monate hinweg und im Bestand 2 bei 60 Schafen in einer einmaligen Untersuchung die Seroprävalenz ermittelt. Zwei Schafe aus Bestand 1 wurden zusätzlich über fünf Wochen hinweg eingestallt und eingehend untersucht.

Das zweite Ziel bestand darin, mögliche Vektoren zu identifizieren. Aus diesem Grund wurden 167 Mäuse, 22 Maulwürfe und vier Spitzmäuse aus dem Endemiegebiet auf die Anwesenheit von BDV-RNA und -Antigen untersucht.

7.1 Bestand 1

7.1.1 Serologie

Von den untersuchten Seren waren zu jedem Entnahmezeitpunkt jeweils mindestens ein Drittel der Tiere seropositiv. Dies entspricht einer recht hohen Seroprävalenz, wenn man diese mit den Resultaten aus früheren Untersuchungen von Rohner-Cotti³⁰ und Götzmann¹³ vergleicht. In jenen Studien waren lediglich in 1 von 283 (0.35 %), bzw. in 13 von 161 (8.07 %) der untersuchten Schaf-Seren Antikörper ermittelt worden. Daraus kann die Folgerung gezogen werden, dass in dem von uns untersuchten Bestand viel mehr Tiere mit dem BDV Kontakt hatten als in den früher untersuchten Herden. Möglicherweise hat sich die Infektion in der Zwischenzeit ausgebreitet. Allerdings ist nicht auszuschliessen, dass gewisse Unterschiede auch methodisch bedingt sind. In der Arbeit von Rohner-Cotti wurde für die Fixierung der Zellkulturen Formalin und für die Zellpermeabilitätserhöhung Triton-X 100 verwendet, in dieser Untersuchung verwendeten wir Azeton. Götzmann benutzte die Astrozytenzelllinie C6, im Gegensatz zu den von uns verwendeten persistent infizierten MDCK-Zellen. Als sekundäre Antikörper wurden früher Fluoreszeinisothiocyanat-markierte (FITC) Konjugate verwendet. Heute werden Alexa-Fluorochrome gebraucht, welche ein etwas stärkeres Signal abgeben und die Sensitivität des Testes erhöhen.

Wenn man die Antikörpertiterentwicklung der einzelnen Schafe betrachtet wird ersichtlich, dass nur sechs Schafe bei allen vier serologischen Untersuchungen positiv waren. Bei all

diesen Tieren waren die Serumantikörpertiter mehrheitlich konstant. Bei drei dieser sechs Tiere waren die Titer mit 1:80 bis 1:160 recht hoch.

Daneben gab es Schafe, die in mindestens einer der ersten Untersuchungen negativ waren und danach zu positiv serokonvertierten. Es scheint auch, dass niedrige Antikörpertiter gewissen Fluktuationen unterliegen, was den Aussagewert von einmaligen serologischen Untersuchungen relativiert. Sechs Schafe waren bei der ersten Untersuchung positiv, bei den darauffolgenden ein oder zwei Untersuchungen negativ und bei der letzten Untersuchung erneut positiv.

Vier Schafe blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum negativ. Bei keinem der untersuchten Schafe veränderte sich ein seropositiver Titer zu einem endgültig negativen Ergebnis.

Da serologische Untersuchungen einen Eindruck über den herrschenden Infektionsdruck vermitteln, kann anhand der Verlaufsuntersuchung vermutet werden, dass sich das BDV in diesem Bestand während der Untersuchungszeitspanne ausgebreitet hat.

7.1.2 Real-Time RT-PCR

Von den zum betreffenden Zeitpunkt vorhandenen 48 Schafen wurde Blut und Sekret aus Nasen- und Maulhöhle entnommen und mit den beschriebenen Verfahren auf BDV-RNA untersucht. Wie im Kapitel Resultate dargestellt, wurde im Blut von fünf Schafen je ein positives Resultat mit den p24 oder den p40 Primern gemessen. Die Cycle-Werte betrugen zwischen 32.40 und 38.25. Nach Umrechnung der Cycle-Werte in kalibrierte Werte konnten relative Viruskopienzahlen von 0.0009719 bis 0.6463 errechnet werden. Aufgrund der Tatsache, dass pro Tier nur eine der vierfach angesetzten Proben positiv war und die relativen Viruskopienzahlen sehr niedrig ausgefallen sind, liegt der Verdacht nahe, dass es sich um falsch positive Resultate infolge von Kontaminationen handelt. Daher wurden alle Blutproben als negativ interpretiert. Da RNA-Viren sehr instabil sind, war es leider nicht möglich an den betreffenden Blutproben die Untersuchungen zu wiederholen, denn um korrekte Ergebnisse erhalten zu können, musste das frische EDTA-Blut innerhalb weniger Stunden verarbeitet werden. In allen vier Ansätzen eindeutig negativ waren die Maulhöhlensekrete. Die Untersuchung der Nasenhöhlensekrete ergab, dass in Proben, in denen Zellen vorhanden waren, keine BDV-RNA nachgewiesen werden konnte.

Da weder in den Sekreten noch im Blut der 48 untersuchten Schafe BDV-RNA nachgewiesen werden konnte, kann zum Zeitpunkt der Entnahme eine Virämie und eine Virusausscheidung

zumindest in diesen Sekreten mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Um eine intermittierende Virusausscheidung zu entdecken, müssten diese sehr aufwändigen Untersuchungen allerdings wiederholt durchgeführt werden. Was auch nicht untersucht wurde, aber ebenfalls einen potentiellen Ausscheidungsweg bei natürlich infizierten Wirten darstellen könnte, ist der Urin, wie dies aus Rattenexperimenten bekannt ist.³²

Nach Ansicht von Ludwig und Bode handelt es sich bei BDV um eine Infektion mit lebenslanger Persistenz. Dabei gibt es lange Phasen von Latenz und nur kurze Phasen der Reaktivierung mit Virusausscheidung.¹⁹ Dies unterstreicht die Notwendigkeit von wiederholten engmaschigen Untersuchungen, um eine allfällige Ausscheidung überhaupt erfassen zu können.

7.2 Verlaufsuntersuchung der 2 Schafe aus dem Bestand 1

Um zumindest an Einzeltieren wiederholte Untersuchungen durchführen zu können, wurden zwei Schafe übernommen und während fünf Wochen eingehend beobachtet und untersucht.

7.2.1 Serologie

Im Zeitpunkt der Übernahme war Schaf Nr. 16 mit einem Titer von 1:160 hochtitrig und Nr. 9g mit 1:40 bis 1:80 ebenfalls klar positiv.

Bei Schaf Nr. 16 bewegte sich der Antikörpertiter zwischen 1:80 bis zu 1:320. Diese Werte werden als hochtitrig angesehen. Am Ende der Untersuchung blieb der Antikörpertiter bei 1:160 über drei Tage konstant (Abb. 10). Bemerkenswert sind die Titeranstiege zwischen 17. und 19.05. sowie zwischen 31.05. und 2.06., welche beide mit einem vorangegangenen Stressereignis koinzidierten. Auch im Liquor cerebrospinalis war zu diesem Zeitpunkt ein positiver Antikörpertiter von 1:40 vorhanden. Leider konnte Liquor nur am Ende der Untersuchungen (bei der Euthanasie) entnommen werden.

Schaf Nr. 9g hatte im Allgemeinen weniger hohe Antikörpertiter, sie bewegten sich zwischen negativ und 1:160. Zu Beginn waren sie mit 1:80 und 1:160 zwar deutlich positiv, nach dem 10. Tag sanken die Antikörper langsam aber stetig gegen null (Abb.10). Der Liquor enthielt zum Zeitpunkt der Euthanasie keine Antikörper.

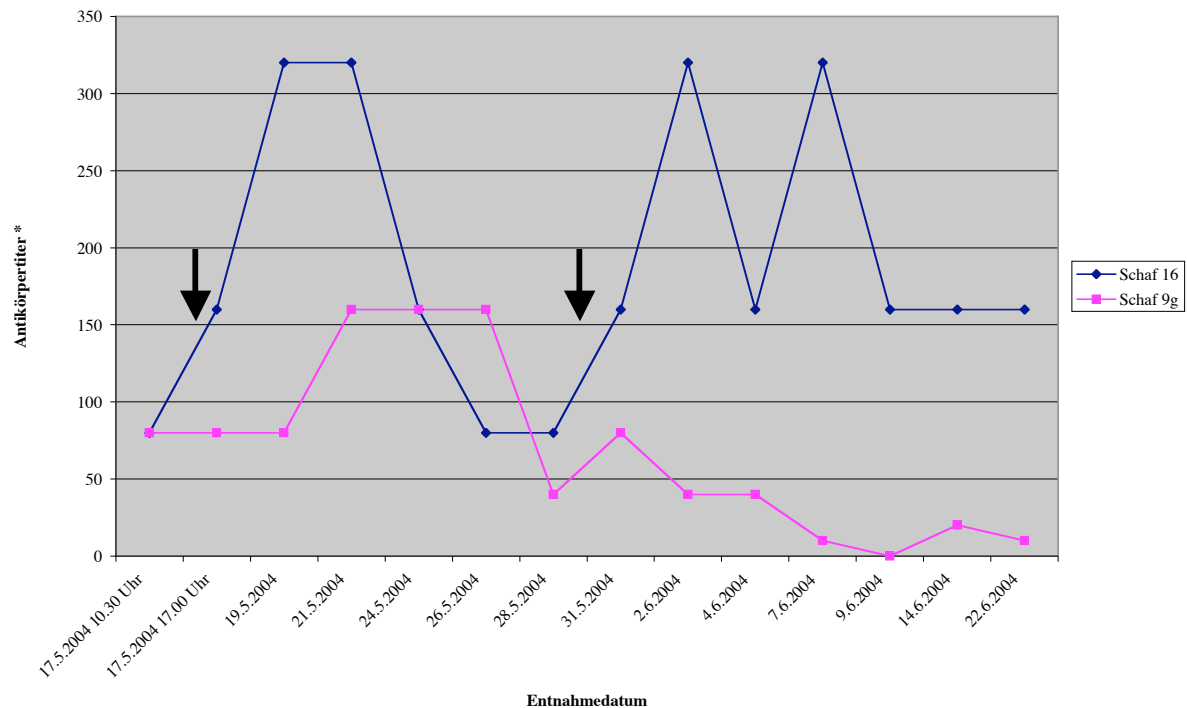


Abb. 10. Übersicht über die Antikörpervverläufe von Schaf Nr. 16 und 9g mit Angabe der Stresseinflüsse.

* Antikörpertiter 1:10 bis 1:320

➔ Stresseinfluss

7.2.2 Real-Time RT-PCR

Bei Schaf Nr. 16 konnte zu mehreren Zeitpunkten in Nasensekret, Speichel und Blut BDV-RNA detektiert werden. Es waren jedoch stets nur einzelne Ansätze positiv. Im Blut waren die relativen Viruskopienzahlen mit 0.00005 bis 0.000142 sehr tief. Jedoch war der RNA-Gehalt im Sekret aus Nasen- und Maulhöhle bedeutend höher, dieser enthielt bis zu 504.779 Viruskopien, was mit der geringen vorhandenen Zellzahl in der untersuchten Probe zusammenhängt (18sr RNA). Dabei handelt es sich um mathematisches Problem, wenn sich im Nenner eine Zahl kleiner als 1 befinden, wird die entsprechende relative Viruskopienzahl trotz geringem normalisiertem Wert der Probe hoch.

Beim Schaf Nr. 9g waren ausser an zwei Zeitpunkten alle Proben negativ. Die Ausnahmen betreffen jenes Blut, welches mit den p24 Primern einmal positiv war (17.05.2004, 10.30 Uhr) und das Maulhöhlensekret vom 21.05.2005, welches auf p24 doppelt positiv getestet worden war. Alle Nasenhöhlensekrete ergaben negative Ergebnisse.

7.2.3 Histologie, Immunhistologie und Real-Time RT-PCR am Gewebe

Nach der Euthanasie der beiden Schafe wurden mehrere Gehirnlokalisationen sowie zahlreiche innere Organe histologisch und immunhistologisch untersucht. Es konnten keine degenerativen und/oder entzündlichen Veränderungen oder Virusantigen gefunden werden. Ebenfalls negativ verliefen die Untersuchungen der Gehirne und diversen Organen mittels Real-Time RT-PCR.

7.2.4 Schlussfolgerung zu den Verlaufsuntersuchungen

Die Verlaufsuntersuchung an den zwei Schafen aus dem Bestand 1, welche darauf ausgelegt war, eine mögliche Viruspersistenz bzw. –Ausscheidung zu erfassen, ergab mehrere interessante Befunde, welche einer Interpretation bedürfen: Beim Schaf Nr. 9g zeigte sich kurz nach dem Einstellen ein leichter Antikörpertiteranstieg, danach jedoch fiel dieser während der Beobachtungszeit kontinuierlich ab. Dies lässt darauf schliessen, dass in dieser neuen Umgebung keine neue Virusexposition stattfand, obwohl die beiden Schafe in einer gemeinsamen Bucht in engem Kontakt standen. Bei diesem Schaf waren auch die Resultate der Real-time RT-PCR negativ, mit Ausnahme einer Blutprobe und einer Maulhöhlensekretprobe, welche mit den p24 Primern sehr schwach positiv reagierten was möglicherweise als falsch positiv (Kontamination) zu interpretieren ist. Das Schaf Nr. 16 zeigte interessanterweise zweimal einen deutlichen Antikörperanstieg, beide Male nach einer Stress-Situation, und zudem fanden sich am Ende der Beobachtungsperiode auch im Liquor cerebrospinalis Antikörper. Auch bei diesem Schaf fanden wir einzelne positive Real-Time RT-PCR Resultate im Blut und in den Nasen- und Maulhöhlensekreten, bei welchen aber auch eine Kontamination nicht sicher ausgeschlossen werden konnte.

Die erwähnten Stress-Situationen ergaben sich einerseits aus dem Transport von Malix nach Zürich mit Adaptation an die neue Umgebung und andererseits aus Blutentnahmen in sitzender Stellung (31.05.2004). Der Stress manifestierte sich auch im Blutbild. Stress verursacht eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems und darauffolgend eine Erhöhung der Interleukin-6- und TNF- α -Produktion. Diese Zytokine wiederum bewirken eine Leukozytose und Lymphopenie.¹² Dies wurde bei Schaf Nummer 16 durch das Stressblutbild mit einer Leukozytose, verursacht durch die Neutrophilie und einer Lymphopenie, bestätigt. Wenn man nun davon ausgeht, dass bei BD ebenfalls latente Infektionen, wie zum Beispiel bei Herpesvirusinfektionen¹¹ möglich sind, wäre durch die Lymphopenie eine Reaktivierung

des BDV mit anschliessender Antikörperproduktion möglich. Dies könnte den Antikörpertiteranstieg ebenfalls erklären.

Die Frage, ob die beiden Schafe oder eines davon BDV in sich trug und möglicherweise ausschied, lässt sich demnach nicht abschliessend beantworten. Hinweise für diese Hypothese liessen sich jedoch nicht finden.

Wie zuvor erwähnt stellt sich nun die Frage, ob es sich bei den positiven Einzelresultaten der Real-Time RT-PCR um echt positive Proben handelt. Man könnte interpretieren, dass die tiefen Werte im Blut darauf zurückzuführen sind, dass nur eine Zelle pro 10^5 - 10^6 weisse Blutzellen wie man von humanen Blutuntersuchungen annimmt, infiziert sind und RNA deshalb schwierig nachweisbar ist.³³ Erschwerend ist, dass infektiöses BDV in den PBMCs im Blut offenbar nur in einem engen Zeitfenster parallel zur akuten Erkrankung vorhanden ist.⁴

Andererseits kann man aufgrund der tiefen Werte und der geringen Anzahl der positiven Ergebnisse eine Kontamination nicht sicher ausschliessen, obwohl mit allergrösster Vorsicht gearbeitet wurde.

Für Kontamination spricht indirekt auch die Tatsache, dass alle mittels Real-Time RT-PCR untersuchten Gehirnlokalisation, wie auch die diversen postmortem untersuchten Organe bei beiden Schafen eindeutig negativ waren. Ludwig et al. (1988) sprechen von einer vermutlich lebenslangen Persistenz von BDV in den Neuronen des limbischen Systems.²⁰ Da bei den zwei Schafen aber auch in diesen Lokalisationen keine Virus-RNA bzw. -Antigen gefunden wurde, erscheint eine persistente Infektion als sehr unwahrscheinlich. Zusätzlich waren Liquor, Galle und bei Schaf Nr. 16 auch Urin in der Real-Time RT-PCR negativ.

Bis anhin wurde angenommen, dass bei positivem Antikörpernachweis im Liquor eine Infektion mit dem Virus sehr wahrscheinlich ist.¹ Bei Schaf Nr. 16 waren Antikörper im Liquor vorhanden, trotzdem konnte mit den verschiedenen Nachweismethoden keine Virus-RNA im Gehirn und anderen Organen/Sekreten gefunden werden. Wie können diese widersprüchlichen Ergebnisse miteinander vereinbart werden? Eine mögliche Erklärung wäre, dass dieses Tier eine erneute Infektion durchgemacht und somit Antikörper gebildet hat, welche in der Folge das Virus eliminieren konnten. Dies würde den vorhandenen Antikörperanstieg erklären, ohne dass Virus-RNA gefunden werden konnte. Eine weitere Erklärung wäre, dass Schaf Nr. 16 latent oder persistent infiziert war und das Virus zum Beispiel durch den erfolgten Stress reaktiviert wurde¹⁰ und dadurch eine erneute Antikörperproduktion erfolgte.

7.3 Bestand 2

In diesem Bestand, in welchem im Januar 2005 ein Schaf an BD erkrankte, beschränkten sich die Untersuchungen auf eine einmalige serologische Untersuchung von ca. 12 % der Tiere.

7.3.1 Histologie und Immunhistologie

Das an BD erkrankte adulte Alpenschaf zeigte histologisch im Gehirn die klassischen Veränderungen wie disseminierte mononukleäre Meningitis und Polioenzephalomyelitis mit Neuronendegeneration. An einigen Stellen, vor allem im limbischen System, waren die pathognostischen Joest-Degen-Einschlusskörperchen in den Neuronen sichtbar.

Neuronen und Gliazellen im Gehirn reagierten mit den beiden monoklonalen Antikörpern p24 und p38/p40 stark positiv.

7.3.2 Real-Time RT-PCR

Die Untersuchung des Gehirnes des aktuellen BD Falles ergab in allen 3 untersuchten Gehirnlokalisationen deutlich positive Resultate. Generell kann man sagen, dass die p24-Werte das 50-80-fache von denen p40-Werten betrug. Nach Watanabe et al. (2000)³⁹ deutet dies eher auf eine persistente als auf eine akute Infektion hin.

Leider konnten wir keine weiteren Untersuchungen an diesem Tier durchführen um zu überprüfen, ob BDV-RNA in anderen Organen oder Sekreten vorhanden war, da nur das Gehirn zur Verfügung stand.

7.3.3 Serologie

Ungefähr drei Monate nach dem aktuellen BD Fall wurde Blut von Schafen genommen, die Kontakt mit dem betroffenen Tier gehabt haben und sich auf der gleichen Weide aufhielten. Von insgesamt ca. 500 Schafen wurden 60 zufällig ausgewählt und serologisch untersucht. Es konnten bei 34 Tieren Antikörper nachgewiesen werden. Die Titer bewegten sich zwischen 1:10 und 1:160.

Der prozentuale Anteil der positiven Tiere (34) an der gesamten Anzahl der untersuchten Tiere (60) ist mit 56.7 % sehr hoch.

Die Seroprävalenz in den beiden untersuchten Schafbeständen war im Vergleich zu früheren Untersuchungen (Rohner-Cotti 1992³⁰ und Götzmann 2001¹³) am 28.04.2005 mit 84.78% im Bestand 1 und 56.7% im Bestand 2 überraschend hoch. Somit muss von einem massiven Infektionsdruck ausgegangen werden. Auch die Feststellung, dass während der Beobachtungsperiode im Bestand 1 zahlreiche Schafe serokonvertierten und die Seroprävalenz massiv zunahm, spricht für eine Neuinfektionen. Es drängt sich erneut die Frage auf, worin die Infektionsquelle besteht. Gibt es möglicherweise persistent infizierte Schafe, welche das Virus in sich beherbergen und ausscheiden, ohne zu erkranken? Oder kommen andere Tiere als Vektoren in Frage?

7.4 Mäuse, Spitzmäuse und Maulwürfe

Die Entscheidung Mäuse, Spitzmäuse und Maulwürfe zu sammeln, um einen möglichen frei lebenden Vektor zu finden, basierte auf den Daten von experimentellen Infektionen bei Nagetieren wie Ratten und Mäusen. Diese konnten das BDV ohne erkennbare Symptome beherbergen und infektiöses Virus ausscheiden.

7.4.1 Histologie und Immunhistologie

Bei der Untersuchung der 189 Gehirne von kleinen Säugetieren aus dem Endemiegebiet und den vier Gehirnen aus den Kontrollgebieten konnten keine histologischen Veränderungen festgestellt werden. Es gab keine Hinweise auf ein entzündliches Geschehen.

Immunhistologisch reagierten drei Gehirne mit p24- und p38/p40-Antikörpern deutlich positiv. Bei diesen drei Tieren handelte es sich um die drei untersuchten Feldspitzmäuse (*Crocidura leucodon*). Es waren somit 100 % der gefangenen Feldspitzmäuse BDV-Antigen positiv. Die restlichen 190 Gehirne waren eindeutig negativ.

Leider standen uns zum Zeitpunkt, als die positiven Ergebnisse des Hirnmaterials vorlagen, nur noch die tiefgefrorenen Herzen der Tiere zur Verfügung.

Es wurden die Herzen der drei im Gehirn positiven Feldspitzmäuse und zusätzlich als Kontrolle zwei Herzen von negativen Mäusen untersucht.

Histologisch waren alle fünf Tiere unauffällig, mittels Immunhistologie konnte bei einem Herz (Nr. 144) BDV-Antigen eindeutig nachgewiesen werden. Die restlichen vier Herzen waren eindeutig negativ.

7.4.2 Real-Time RT-PCR

Die Untersuchung der Gehirne mittels Real-Time RT-PCR brachte bei drei Gehirnen deutlich positive Resultate. Bei diesen Tieren handelte es sich um die drei Feldspitzmäuse. Die restlichen 190 Gehirne waren eindeutig negativ. Aufgrund der positiven Resultate der drei Feldspitzmäuse wurde deren Herz ebenfalls untersucht. Hier waren die Herzen der Mäuse Nummer 134 und 144 mit relativen Viruskopienzahlen von 1.051 bis 4.15 deutlich und jenes von Maus Nummer 137 schwach positiv. Die Werte der Viruskopienzahlen waren mit 0.0154 und 0.022 relativ gering. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass nur ein Drittel des normal verwendeten Materials zur Verfügung stand, nämlich 10 μ g anstelle von 30 μ g. Die Feststellung, dass das Virus auch ausserhalb des Zentralnervensystems nachweisbar ist, konnte noch bei keinem unserer natürlich infizierten BD-Fälle gemacht werden.

Die Tatsache, dass von 167 Mäusen verschiedener Art, 22 Maulwürfen, drei Feldspitzmäusen und einer Waldspitzmaus gerade die drei vorhandenen Feldspitzmäuse BDV positiv waren, lässt den Schluss zu, dass hiermit Vektoren für BD gefunden wurden. Die relativ grosse Menge an Antigen ohne die Präsenz von Läsionen lässt vermuten, dass es sich um eine persistierende Infektion ohne Immunreaktion handelt. Somit sind Hypothesen bezüglich der Übertragungskette möglich. Wenn man davon ausgeht, dass die Feldspitzmaus das Virus ebenfalls wie persistent infizierte Ratten³² mit dem Urin ausscheiden, könnte eine Kontamination des Futters von empfänglichen Tierarten erfolgen. Nach anschliessender Futteraufnahme durch Schafe, Pferde etc. könnte das BDV von der Nasen- bzw. Maulhöhle via Nervenbahnen wie N. trigeminus oder N. olfactorius das Gehirn erreichen.⁷ Dieser Infektionsweg über die Nervenbahnen entspricht dem heutigen Wissenstand.

Da es sich um ein RNA-Virus handelt, dessen Stabilität in der Umwelt sehr eingeschränkt ist, könnte man zudem schlussfolgern, dass bei zu langer Exposition durch Umwelteinflüssen eine Inaktivierung erfolgt. Das inaktivierte Virus wäre somit möglicherweise nicht mehr pathogen, jedoch eventuell immer noch immunogen und könnte demzufolge eine Antikörperreaktion stimulieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass frisch kontaminiertes Futter innerhalb kurzer Zeit von einem empfänglichen Tier in genügender Menge aufgenommen wird, ist eher gering. Somit wäre die Virusmenge und -virulenz reduziert und das sporadische Auftreten von BD Fällen und die gleichzeitig hohe Seroprävalenz erklärbar.

7.4.3 Crocidura leucodon

Bei der gefundenen Tierart *Crocidura leucodon* handelt es sich um einen Insektenfresser, der sich in erster Linie im offenen Flachland, unter Hecken, in Sumpfgebieten und im Brachland in Bodennähe aufhält. Sie kommt hauptsächlich bis zu 1'600 m über Meer im Rheintal, Tessin, Rhôneal und in Basel vor.²⁸ Durch ihren hohen Stoffwechsel haben sie einen sehr grossen Nahrungsbedarf, der in etwa der Hälfte bis Dreiviertel ihres Körpergewichtes entspricht. Die meiste Zeit des Tages sind sie deshalb mit der Futtersuche beschäftigt.

Die zwei untersuchten Schafbestände stellen eher ältere Stallformen dar, das Futter wird vom Boden oder in Trögen, die am Boden stehen, aufgenommen. Dazu kommt, dass in den Ställen an mehreren Stellen offene Schlupflöcher in den Wänden vorhanden sind. Durch diese Umstände befindet sich das Futter der Schafe und Pferde grundsätzlich in guter Reichweite für die Spitzmäuse. Aufgrunddessen wäre die erwähnte Theorie für die Übertragungskette mittels Kontamination des Futters im Bereich des Möglichen.

Diese Ergebnisse liefern sehr wichtige Hinweise auf die Übertragung der BDV-Infektion und stellen somit einen wesentlichen Fortschritt in der Erforschung der Übertragung von BDV dar. Natürlich sind weitere Untersuchungen nötig um abzuklären, ob diese Funde reproduzierbar sind, und ob in positiven Feldspitzmäusen Virus auch in anderen Organen und Sekreten und Ausscheidungen wie z.B. Harn vorhanden ist.

8 Literaturverzeichnis

1. Bechter, K. in *Borna Disease Virus - A veterinary and public health problem?* 41 (Rhondda, Wales, United Kingdom, 2000).
2. Berg, M., Johansson, M., Montell, H. & Berg, A. L. Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiol Infect* **127**, 173-8 (2001).
3. Bode, L., Durrwald, R., Rantam, F. A., Ferszt, R. & Ludwig, H. First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders. *Mol Psychiatry* **1**, 200-12 (1996).
4. Bode, L. & Ludwig, H. Clinical similarities and close genetic relationship of human and animal Borna disease virus. *Arch Virol Suppl* **13**, 167-82 (1997).
5. Briese, T., Schneemann, A., Lewis, A. J., Park, Y. S., Kim, S., Ludwig, H. & Lipkin, W. I. Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4362-6 (1994).
6. Caplazi, P., Melzer, K., Goetzmann, R., Rohner-Cotti, A., Bracher, V., Zlinszky, K. & Ehrensperger, F. [Borna disease in Switzerland and in the principality of Liechtenstein]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **141**, 521-7 (1999).
7. Carbone, K. M., Duchala, C. S., Griffin, J. W., Kincaid, A. L. & Narayan, O. Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J Virol* **61**, 3431-40 (1987).
8. Carstens, v. R., Fauquet, Bishop. Virus Taxonomy. *Virology Division*, 531-538.
9. Cubitt, B. & de la Torre, J. C. Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J Virol* **68**, 1371-81 (1994).
10. Durrwald, R. & Ludwig, H. Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Zentralbl Veterinarmed B* **44**, 147-84 (1997).
11. Gibson, J. S., Slater, J. D., Awan, A. R. & Field, H. J. Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Arch Virol* **123**, 351-66 (1992).
12. Goebel, M. U., Mills, P. J., Irwin, M. R. & Ziegler, M. G. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production after acute psychological stress, exercise, and infused isoproterenol: differential effects and pathways. *Psychosom Med* **62**, 591-8 (2000).
13. Götzmann, m. v. R. Untersuchungen zur Epidemiologie der Borna Disease Virus-Infektion bei Schafen und Ziegen in der Schweiz und im Fürstentum Liechtenstein. 72 (2001).
14. Grabner, A. & Fischer, A. [Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years]. *Tierarztl Prax* **19**, 68-73 (1991).
15. Herzog, S., Kompter, C., Frese, K. & Rott, R. Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **173**, 171-7 (1984).
16. Joest, E. D., K. Über eigentümliche Kerneinschlüsse bei der enzootischen Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde. (1911).
17. Katz, J. B., Alstad, D., Jenny, A. L., Carbone, K. M., Rubin, S. A. & Waltrip, R. W., 2nd. Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies. *J Vet Diagn Invest* **10**, 338-43 (1998).
18. Kohno, T., Goto, T., Takasaki, T., Morita, C., Nakaya, T., Ikuta, K., Kurane, I., Sano, K. & Nakai, M. Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* **73**, 760-6 (1999).

19. Ludwig, H. & Bode, L. The neuropathogenesis of Borna disease virus infections. *Intervirology* **40**, 185-97 (1997).
20. Ludwig, H., Bode, L. & Gosztonyi, G. Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Prog Med Virol* **35**, 107-51 (1988).
21. Ludwig, H., Kraft, W., Kao, M., Gosztonyi, G., Dahme, E. & Krey, H. [Borna virus infection (Borna disease) in naturally and experimentally infected animals: its significance for research and practice]. *Tierarztl Prax* **13**, 421-53 (1985).
22. Lundgren, A. L. & Ludwig, H. Clinically diseased cats with non-suppurative meningoencephalomyelitis have Borna disease virus-specific antibodies. *Acta Vet Scand* **34**, 101-3 (1993).
23. Metzler, A., Frei, U. & Danner, K. [Virologically confirmed outbreak of Borna's disease in a Swiss herd of sheep]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **118**, 483-92 (1976).
24. Morales, J. A., Herzog, S., Kompter, C., Frese, K. & Rott, R. Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **177**, 51-68 (1988).
25. Müller-Doblies, D., Suter, M., Ackermann, M.,. *TPT:/Vorlesung/Portrats0203.doc*.
26. Nakamura, Y., Asahi, S., Nakaya, T., Bahmani, M. K., Saitoh, S., Yasui, K., Mayama, H., Hagiwara, K., Ishihara, C. & Ikuta, K. Demonstration of borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells derived from domestic cats in Japan. *J Clin Microbiol* **34**, 188-91 (1996).
27. Nakamura, Y., Kishi, M., Nakaya, T., Asahi, S., Tanaka, H., Sentsui, H., Ikeda, K. & Ikuta, K. Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy horses in Japan. *Vaccine* **13**, 1076-9 (1995).
28. Niethammer, J., Krapp, F. *Handbuch der Säugetiere Europas. Insektenfresser-Herrentiere* (Aula-Verlag, Wiesbaden, 1990).
29. Richt, J. A. & Rott, R. Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Vet J* **161**, 24-40 (2001).
30. Rohner-Cotti, m. v. A. Untersuchungen zur Prävalenz der Bornavirusinfektion bei Schafen und Pferden in der Ostschweiz und dem Fürstentum Liechtenstein., 76 (1992).
31. Rott, R. & Becht, H. Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* **190**, 17-30 (1995).
32. Sauder, C. & Staeheli, P. Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J Virol* **77**, 12886-90 (2003).
33. Sauder, C. & de la Torre, J. C. Sensitivity and reproducibility of RT-PCR to detect Borna disease virus (BDV) RNA in blood: implications for BDV epidemiology. *J Virol Methods* **71**, 229-45 (1998).
34. Schindler, R. Real Time RT-PCR for tracing and quantification of Borna Disease Virus RNA in diseased hosts compared to experimentally inoculated ticks. (2004).
35. Schmidt, J. Die Bornakrankheit des Pferdes. 55 Jahre Forschung und Lehre. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin* **6**, 177-87 (1952).
36. Sierra-Honigsmann, A. M., Rubin, S. A., Estafanous, M. G., Yolken, R. H. & Carbone, K. M. Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats. *J Neuroimmunol* **45**, 31-6 (1993).
37. Staeheli, P., Sauder, C., Hausmann, J., Ehrensperger, F. & Schwemmle, M. Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol* **81**, 2123-35 (2000).
38. Stitz, L., Bilzer, T., Richt, J. A. & Rott, R. Pathogenesis of Borna disease. *Arch Virol Suppl* **7**, 135-51 (1993).

39. Watanabe, M., Zhong, Q., Kobayashi, T., Kamitani, W., Tomonaga, K. & Ikuta, K. Molecular ratio between borna disease viral-p40 and -p24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA. *Microbiol Immunol* **44**, 765-72 (2000).
40. Weissenbock, H., Suchy, A., Caplazi, P., Herzog, S. & Nowotny, N. Borna disease in Austrian horses. *Vet Rec* **143**, 21-2 (1998).
41. Zimmermann, W., Breter, H., Rudolph, M. & Ludwig, H. Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. *J Virol* **68**, 6755-8 (1994).

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit zu schreiben. Im Besonderen sind dies:

Herr Prof. Dr. Felix Ehrensperger, Institut für Veterinärpathologie, Abteilung Immunpathologie, Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich, für die Überlassung des interessanten Themas und die stets gewährte, gut Unterstützung.

Frau PD. Dr. Monika Engels, Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich, für die Übernahme des Korreferats, die schnelle Durchsicht meines Manuskripts, die freundliche Unterstützung bei Fragen und die Benützung der Räumlichkeiten und Geräten im Virologischen Institut der Universität Zürich.

Frau Dr. Monika Hilbe und Frau Katalin Zlinsky für die menschliche und fachliche Unterstützung und Mitarbeit an meiner Disseration.

Dem Institut für Veterinärpathologie für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Meiner Familie für die Ermöglichung meiner Ausbildung und die Unterstützung die sie mir jederzeit zuteil kommen liessen.

Lebenslauf

Name Romana Herrsche

Geburtsdatum 22. März 1977

Geburtsort Olten

Heimatort Lohn (SO)

1984 – 1990 Primarschule Olten (SO)

1990 – 1993 Bezirksschule Olten (SO)

1993 – 1998 Kantonsschule Olten (SO), Matura Typus E

1998 – 2003 Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät
der Universität Bern

2003 Staatsexamen

2004 – 2006 Doktorandin bei Prof. Dr. F. Ehrensperger am Institut für
Veterinärpathologie, Abteilung Immunpathologie,
Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich.

Anhang

Tab. A. Auszug aus dem Blutbild von Schaf Nr. 16.

Zellart	17.05.04 10.30 Uhr	17.05.04 15.00 Uhr	19.05.04	Referenzbereich
Leukozyten	$8.7 * 10^3/\mu\text{l}$	$9.5 * 10^3/\mu\text{l}$	$7.2 * 10^3/\mu\text{l}$	$4'000-12'000 * 10^3/\mu\text{l}$
Segmentkernige Neutrophile	$3.13 * 10^3/\mu\text{l}$	$5.56 * 10^3/\mu\text{l}$	$2.48 * 10^3/\mu\text{l}$	$700-6'000 * 10^3/\mu\text{l}$
Lymphozyten	$4.61 * 10^3/\mu\text{l}$	$3.75 * 10^3/\mu\text{l}$	$3.74 * 10^3/\mu\text{l}$	$2'000-9'000 * 10^3/\mu\text{l}$
Segmentkernige Neutrophile	36.0%	58.5%	34.5%	
Lymphozyten	53.0%	39.5%	52.0%	
Blutbeurteilung	normal	normal	wenig Thrombozyten in Haufen	

Tab. B. Auszug aus dem Blutbild von Schaf Nr. 9g.

Zellart	17.05.04 10.30 Uhr	17.05.04 15.00 Uhr	19.05.04	Referenzbereich
Leukozyten	$6.6 * 10^3/\mu\text{l}$	$11.0 * 10^3/\mu\text{l}$	$7.1 * 10^3/\mu\text{l}$	$4'000-12'000 * 10^3/\mu\text{l}$
Segmentkernige Neutrophile	$2.31 * 10^3/\mu\text{l}$	$7.32 * 10^3/\mu\text{l}$	$3.34 * 10^3/\mu\text{l}$	$700-6'000 * 10^3/\mu\text{l}$
Lymphozyten	$3.37 * 10^3/\mu\text{l}$	$3.30 * 10^3/\mu\text{l}$	$2.80 * 10^3/\mu\text{l}$	$2'000-9'000 * 10^3/\mu\text{l}$
Segmentkernige Neutrophile	35%	66.5%	47.0%	
Lymphozyten	51.0%	30.0%	39.5%	
Blutbeurteilung	mässig Thrombozyten in Haufen	normal	normal	

Tab. C. Übersicht über die Bestandesuntersuchungen des Bestandes 1.

Schaf-Nr.	Serologie				TaqMan®			
	11.12.03	18.3.04	11.11.04	28.11.05	Primer	Blut	Nasensekret	Speichel
2	Negativ	1:20	1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/35.21	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5	1:20-1:40	Negativ	1:40-1:80	1:20	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6	*	1:10-1:20	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
7	Negativ	Negativ	Negativ	1:80	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
8	*	Negativ	1:80	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
9	Negativ	*	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
9g	1:40-1:80	1:20-1:40	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
10	1:10	1:10	1:20-1:40	1:20	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
10W	1:40	1:20	1:20-1:40	1:160	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
11	Negativ	Negativ	1:80	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
13	1:20	Negativ	1:80	1:80	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
14	Negativ	1:10	1:10-1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
15	Negativ	Negativ	1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
16	1:160	1:160	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
389	Negativ	1:10-1:20	Negativ	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
400	Negativ	Negativ	Negativ	1:20	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
837	1:40	1:40-1:80	1:80	1:80	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
840	Negativ	Negativ	1:10-1:20	1:160	p40 p24	40.00/38.25 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
878	Negativ	Negativ	1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
884	Negativ	1:20	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
885	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
891	*	1:20	1:10-1:20	1:80	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
991	Negativ	*	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
2361	*	*	1:10-1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
5390	Negativ	1:20	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5842	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5861	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5865	1:80	1:80-1:160	1:20-1:40	1:80	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5866	1:20	Negativ	1:20-1:40	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5888	*	*	1:20	1:80	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5889	*	*	Negativ	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5895	*	*	Negativ	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5897	*	*	1:10-1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00

Schaf-Nr.	Serologie				TaqMan®			
	11.12.03	18.3.04	11.11.04	28.11.05	Primer	Blut	Nasensekret	Speichel
5900	*	*	1:10-1:20	1:10	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5901	*	*	1:20-1:40	1:10	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5902	*	*	Negativ	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5903	*	*	Negativ	1:80	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5905	*	*	1:40	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5911	*	*	Negativ	Negativ	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5912	*	*	1:10-1:20	1:20	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5913	*	*	1:10	Negativ	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
5923	*	*	*	Negativ	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6887	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	p40 p24	40.00/40.00 40.00/35.16	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6893	1:80	Negativ	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6894	1:160	1:160	1:80	1:160	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6896	Negativ	Negativ	Negativ	1:20	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6899	1:20	Negativ	1:20-1:40	1:20	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6902	1:10	1:10-1:20	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6911	Negativ	Negativ	1:20-1:40	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6921	1:40	Negativ	Negativ	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6925	Negativ	Negativ	Negativ	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
6934	1:20	1:20	1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6940	Negativ	Negativ	1:40	1:20	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6943	1:40	*	1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6951	Negativ	1:10-1:20	1:10-1:20	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
6972	1:80-1:160	Negativ	1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6976	Negativ	Negativ	1:10-1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/32.74	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
6978	Negativ	Negativ	1:10-1:20	1:10	p40 p24	40.00/32.40 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
6979	*	Negativ	1:20	1:40	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	Kein Resultat	40.00/40.00 40.00/40.00
6985	1:40	Negativ	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00
6997	Negativ	*	*	*	p40 p24	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00	40.00/40.00 40.00/40.00

• => nicht vorhanden
kein Resultat => keine Zellen in der Probe vorhanden.

Tab. D. Real-Time RT-PCR-Untersuchung und Berechnung der relativen Viruskopienzahlen des Blutes von Schaf Nr. 16.

Datum	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
17.05.04 10.30 Uhr	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	20.92	n.d.		
17.05.04 15.00 Uhr	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	16.73	n.d.		
19.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	37.25 35.64	19.744492 63.357637	41.551064	0.00005
	18sr RNA	12.24	839149.8		
21.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	34.02 36.38	204.78447 37.073645	120.92906	0.000142
	18sr RNA	12.22	851'400.21		
24.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	40.00	n.d.		
26.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	16.55	n.d.		
28.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	29.86	n.d.		
31.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	23.46	n.d.		
02.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	14.68	n.d.		
04.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	32.52	n.d.		
07.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	13.72	n.d.		
09.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	10.45	n.d.		
14.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	11.85	n.d.		
22.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	10.86	n.d.		

Tab. E. Real-Time RT-PCR-Untersuchung und Berechnung der relativen Viruskopienzahlen des Speichels von Schaf Nr. 16.

Datum	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
17.05.04 15.00 Uhr	p40	40.00 36.12	2.651597 38.732434	20.692166	3.7608558
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	28.71	5.5019834		
19.05.04	p40	40.00/40.00			
	p24	36.93 36.47	24.893591 34.734403	29.813997	1.0014287
	18sr RNA	26.38	29.771462		
21.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	33.06	n.d.		
24.05.05	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 38.76	2.6949909 6.6152074	4.6550991	44.878244
	18sr RNA	34.19	0.1037273		
26.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	26.55	n.d.		
28.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	35.63	n.d.		
31.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	34.74	n.d.		
02.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	29.55	n.d.		
04.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	34.46	n.d.		
07.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	22.94	n.d.		
09.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	21.03	n.d.		
14.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	22.98	n.d.		

Tab. F. Real-Time RT-PCR-Untersuchung und Berechnung der relativen Viruskopienzahlen des Nasensekrets
Schaf Nr. 16.

Datum	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
17.05.04 15.00 Uhr	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	36.06	n.d.		
19.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	37.71 40.00	14.150562 2.6949909	8.4227764	0.1087012
	18sr RNA	25.06	77.485615		
21.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 36.66	2.6949909 30.269406	16.482198	2.4455484
	18sr RNA	23.43	6.7396736		
24.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	36.38 40.00	37.073645 2.6949909	19.884318	243.48552
	18sr RNA	34.52	0.0816653		
26.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	30.21	n.d.		
28.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 36.72	2.6949909 28.98235	15.838671	504.77959
	18sr RNA	35.84	0.0313774		
31.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	38.44	n.d.		
02.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	30.51	n.d.		
04.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	37.51	n.d.		
07.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	17.59	n.d.		
09.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	19.06	n.d.		
14.06.05	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	29.50	n.d.		
22.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	21.61	n.d.		

Tab. G. Real-Time RT-PCR-Untersuchung und Berechnung der relativen Viruskopienzahlen des Blutes von Schaf Nr. 9g.

Datum	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
17.05.04 10.30 Uhr	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00 37.05	2.6949909 22.821646	12.758318	0.0000028
	18sr RNA	9.90	4'573'698.2		
19.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	24.13	n.d.		
21.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	11.63	n.d.		
24.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	40.00	n.d.		
26.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	16.51	n.d.		
28.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	37.28	n.d.		
31.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	25.04	n.d.		
02.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	14.48	n.d.		
04.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	25.87	n.d.		
07.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	14.87	n.d.		
09.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	11.75	n.d.		
14.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	11.86	n.d.		
22.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	11.75	n.d.		

Tab. H. Real-Time RT-PCR-Untersuchung und Berechnung der relativen Viruskopienzahlen des Speichels von Schaf Nr. 9g.

Datum	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
17.05.04 15.00 Uhr	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	18.94	n.d.		
19.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	27.02	n.d.		
21.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	33.51 32.93	296.27469 450.92824	373.60147	9'239.3736
	18sr RNA	35.49	0.0404358		
24.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	35.65	n.d.		
26.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	27.08	n.d.		
28.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	36.71	n.d.		
31.05.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	29.40	n.d.		
02.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	27.04	n.d.		
04.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	36.57	n.d.		
07.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	22.69	n.d.		
09.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	20.24	n.d.		
14.06.04	p40	40.00/40.00	n.d.		
	p24	40.00/40.00	n.d.		
	18sr RNA	22.70	n.d.		

Tab. I. Real-Time RT-PCR-Untersuchung und Berechnung der relativen Viruskopienzahlen des Nasensekretes von Schaf Nr. 9g.

Datum	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)
17.05.04 15.00 Uhr	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	29.35		n.d.	
19.05.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	33.87		n.d.	
21.05.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	26.43		n.d.	
24.05.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	23.06		n.d.	
26.05.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	29.67		n.d.	
28.05.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	25.56		n.d.	
31.05.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	34.70		n.d.	
02.06.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	32.51		n.d.	
04.06.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	33.35		n.d.	
07.06.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	29.70		n.d.	
09.06.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	21.83		n.d.	
14.06.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	19.76		n.d.	
22.06.04	p40	40.00/40.00		n.d.	
	p24	40.00/40.00		n.d.	
	18sr RNA	25.28		n.d.	

n.d. = Ct-Werte von 40.00 wurden nicht ausgerechnet, da keine relative Viruskopienzahl in einer negativen Probe vorhanden ist.

Tab. J. Resultate der Real-Time RT-PCR-Untersuchung bei Schaf Nr. 16 post mortem.

Material	Histologie	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)	IHC	
							AK	Resultat
Kortex	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	12.76	n.d.				
Ammonshorn	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	27.34	n.d.				
Kleinhirn	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	12.08	n.d.				
Medulla oblongata	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	20.51	n.d.				
Trigeminalganglion	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	16.63	n.d.				
Riechhirn	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	16.90	n.d.				
Rückenmark	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	18.59	n.d.				
Liquor	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		n.d.	n.d.	
		p24	40.00/40.00	n.d.				
		18sr RNA	17.17	n.d.				
Urin	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		n.d.	n.d.	
		p24	40.00/40.00	n.d.				
		18sr RNA	18.30	n.d.				
Galle	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		n.d.	n.d.	
		p24	40.00/40.00	n.d.				
		18sr RNA	31.39	n.d.				
Herz	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	23.03	n.d.				
Lunge	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ	
		p24	n.d.	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	n.d.	n.d.				
Niere	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	14.38	n.d.				

Material	Histologie	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)	IHC		
							AK	Resultat	
Harnblase	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ		
		p24	40.00/40.00	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	20.64	n.d.					
Urin	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		n.d.	n.d.		
		p24	40.00/40.00	n.d.					
		18sr RNA	18.30	n.d.					
Nebenniere	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ		
		p24	40.00/40.00	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	21.58	n.d.					
Retina	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ		
		p24	n.d.	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.	n.d.					
Nasenschleimhaut	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ		
		p24	40.00/40.00	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	20.62	n.d.					
Tonsille	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ		
		p24	n.d.	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.	n.d.					
Speicheldrüse	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ		
		p24	n.d.	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.	n.d.					
Leber	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ		
		p24	n.d.	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.	n.d.					
Uterus	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ		
		p24	n.d.	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.	n.d.					
Mamma	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ		
		p24	n.d.	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.	n.d.					
Knochenmark	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ		
		p24	40.00/40.00	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	18.04	n.d.					
Milz	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ		
		p24	40.00/40.00	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	18.37	n.d.					
Mediastinal-lymphknoten	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ		
		p24	n.d.	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.	n.d.					
Thymus	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ		
		p24	n.d.	n.d.				p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.	n.d.					

Tab. K. Resultate der Real-Time RT-PCR-Untersuchung bei Schaf Nr. 9g post mortem.

Datum Material	Histologie	Primer	Cycle- Threshold- Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)	IHC	
							AK	Resultat
Kortex	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	13.43	n.d.				
Ammonshorn	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	11.78	n.d.				
Kleinhirn	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		p24	Negativ	
		p24	40.00/40.00	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	12.40	n.d.				
Trigeminalganglion	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ	
		p24	n.d.	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	n.d.	n.d.				
Rückenmark	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ	
		p24	n.d.	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	n.d.	n.d.				
Liquor	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		n.d.		
		p24	40.00/40.00	n.d.				
		18sr RNA	17.59	n.d.				
Galle	o.B.	p40	40.00/40.00	n.d.		n.d.		
		p24	40.00/40.00	n.d.				
		18sr RNA	32.09	n.d.				
Retina	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ	
		p24	n.d.	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	n.d.	n.d.				
Nasenschleimhaut	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ	
		p24	n.d.	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	n.d.	n.d.				
Konchen	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ	
		p24	n.d.	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	n.d.	n.d.				
Maul-Schleimhaut	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ	
		p24	n.d.	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	n.d.	n.d.				
Speicheldrüse	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ	
		p24	n.d.	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	n.d.	n.d.				
Tonsille	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ	
		p24	n.d.	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	n.d.	n.d.				
Retropharyngeal- lymphknoten	o.B.	p40	n.d.	n.d.		p24	Negativ	
		p24	n.d.	n.d.		p38	Negativ	
		18sr RNA	n.d.	n.d.				

Material	Histologie	Primer	Cycle-Threshold-Wert	Normalisierter Wert	Durchschnitt normalisierte Werte	Kalibrierter Wert (relative Viruskopienzahl)	IHC	
							AK	Resultat
Herz	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Lunge	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Thymus	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Niere	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Harnblase	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Uterus	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Mamma	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Nebenniere	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Leber	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Darm	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Mediastinal-Lymphknoten	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			
Haut	o.B.	p40	n.d.		n.d.		p24	Negativ
		p24	n.d.		n.d.		p38	Negativ
		18sr RNA	n.d.		n.d.			

n.d. = Ct-Werte von 40.00 wurden nicht ausgerechnet, da keine relative Viruskopienzahl in einer negativen Probe vorhanden ist.

Tab. L. Übersicht über die Spezies, Herkunft und Resultate der Immunhistologie und Real-Time RT-PCR der gesammelten Mäuse, Spitzmäuse und Maulwürfe.

Nr.	Spezies	Herkunft/Sammeldatum	Immunhistologie	Real-Time RT-PCR
37	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
38	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
39	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
40	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
41	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
42	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
43	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
44	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
45	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
46	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
47	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
48	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
49	Maulwurf	Kinderheim Palfrei, Schulhaus oberhalb der Kirche	Negativ	Negativ
50	Maulwurf	29.04.99, Malix	Negativ	Negativ
51	Maulwurf	29.04.99, Malix	Negativ	Negativ
52	Arvicola terrestris	Malix, Wiese	Negativ	Negativ
53	Arvicola terrestris	Malix, Wiese	Negativ	Negativ
54	Arvicola terrestris	1.05.99, Malix	Negativ	Negativ
55	Arvicola terrestris	1.05.99, Malix	Negativ	Negativ
56	Arvicola terrestris	1.05.99, Malix	Negativ	Negativ
57	Arvicola terrestris	27.04.99, Malix Umgebung Mühle	Negativ	Negativ
58	Arvicola terrestris	27.04.99, Malix Umgebung Mühle	Negativ	Negativ
59	Arvicola terrestris	27.04.99, Malix Umgebung Mühle	Negativ	Negativ
60	Arvicola terrestris	29.04.99, Malix	Negativ	Negativ
61	Arvicola terrestris	29.04.99, Malix	Negativ	Negativ
62	Arvicola terrestris	29.04.99, Malix	Negativ	Negativ
63	Arvicola terrestris	29.04.99, Malix	Negativ	Negativ
64	Arvicola terrestris	29.04.99, Malix	Negativ	Negativ
65	Arvicola terrestris	27.04.99, Malix Umgebung Mühle	Negativ	Negativ
66	Arvicola terrestris	27.04.99, Malix Umgebung Mühle	Negativ	Negativ
67	Arvicola terrestris	27.04.99, Malix Umgebung Mühle	Negativ	Negativ
68	Arvicola terrestris	27.04.99, Malix Umgebung Mühle	Negativ	Negativ
69	Arvicola terrestris	27.04.99, Malix Umgebung Mühle	Negativ	Negativ
70	Arvicola terrestris	Malix, Wiese	Negativ	Negativ
71	Arvicola terrestris	Malix, Wiese	Negativ	Negativ
72	Arvicola terrestris	Malix, Wiese	Negativ	Negativ
73	Arvicola terrestris	Malix, Wiese	Negativ	Negativ
74	Apodemus sylvaticus	10.05.99, Neuer Mühle Stall	Negativ	Negativ
75	Sorex araneus	22.07.99, Mühle hinter dem Stall	Negativ	Negativ
76	Mus musculus	Niderweningen, Kontrolltier, 27.01.99	Negativ	Negativ
77	Maulwurf	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ
78	Arvicola terrestris	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ
79	Apodemus sp.	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ

Nr.	Spezies	Herkunft/Sammeldatum	Immunhistologie	Real-Time RT-PCR
80	Apodemus sp.	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ
81	Arvicola terrestris	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ
82	Arvicola terrestris	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ
83	Apodemus sp.	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ
84	Apodemus sp.	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ
85	Arvicola terrestris	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ
86	Apodemus sp.	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ
87	Apodemus sp.	Jenaz, März/April 2000	Negativ	Negativ
88	Apodemus sp.	Chur 7.07.00	Negativ	Negativ
89	Apodemus sp.	Malix, Pferdestall, 30.11.00	Negativ	Negativ
90	Apodemus sp.	Malix, Pferdestall, 2.12.00	Negativ	Negativ
91	Apodemus sp.	Malix, Pferdestall, 5.12.00	Negativ	Negativ
92	Clethrionomys glareolus	Malix, alter Stall, 14.03.01	Negativ	Negativ
93	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 15.03.01	Negativ	Negativ
94	Maulwurf	Bonaduz, 9.12.00	Negativ	Negativ
95	Maulwurf	Bonaduz, 26.11.00	Negativ	Negativ
96	Maulwurf	Bonaduz, 6.12.00	Negativ	Negativ
97	Maulwurf	Bonaduz, 8.12.00	Negativ	Negativ
98	Apodemus sp.	Malix, Alter Stall, 16.03.01	Negativ	Negativ
99	Arvicola terrestris	Bassersdorf, Kontrolltier, 28.06.02	Negativ	Negativ
100	Maulwurf	Malix, 9.07.02	Negativ	Negativ
101	Maulwurf	Malix, 9.07.02	Negativ	Negativ
102	Maulwurf	Malix, 9.07.02	Negativ	Negativ
103	Arvicola terrestris	Malix, 9.07.02	Negativ	Negativ
104	Arvicola terrestris	Malix, 9.07.02	Negativ	Negativ
105	Arvicola terrestris	Malix, 9.07.02	Negativ	Negativ
106	Arvicola terrestris	Malix, 9.07.02	Negativ	Negativ
107	Apodemus sp.	Bassersdorf, 2.10.02+C130	Negativ	Negativ
108	Apodemus sp.	Bassersdorf, 15.10.02	Negativ	Negativ
114	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 25.10.03	Negativ	Negativ
115	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 28.01.03	Negativ	Negativ
116	Apodemus sp.	Malix, Stall, 21.12.02	Negativ	Negativ
117	Clethrionomys glareolus	Unbekannt	Negativ	Negativ
118	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
119	Apodemus sp.	Malix, Stall, 17.12.02	Negativ	Negativ
120	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
121	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 25.10.03	Negativ	Negativ
122	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 25.10.03	Negativ	Negativ
123	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
124	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
125	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
126	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 15.11.03	Negativ	Negativ
127	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 14.10.03	Negativ	Negativ
128	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
129	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 19.10.03	Negativ	Negativ

Nr.	Spezies	Herkunft/Sammeldatum	Immunhistologie	Real-Time RT-PCR
130	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
131	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
132	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
133	Apodemus sp.	Malix, Stall vor dem Haus, 12.12.02	Negativ	Negativ
134	Crocidura leucodon	Malix, Stall vor dem Haus, 12.12.02	Positiv	Positiv
		Herz	Negativ	Positiv
135	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
136	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 18.10.03	Negativ	Negativ
137	Crocidura leucodon	Malix, Haus, 15.01.03	Positiv	Positiv
		Herz	Negativ	Positiv
138	Apodemus sp.	Malix,, alter Stall, 22.04.03	Negativ	Negativ
139	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 7.03.03	Negativ	Negativ
140	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
141	Apodemus sp.	Malix, im Haus, 8+9.12.02	Negativ	Negativ
142	Apodemus sp.	Malix, im Haus, 8+9.12.02	Negativ	Negativ
143	Apodemus sp.	Malix, im Haus, 8+9.12.02	Negativ	Negativ
144	Crocidura leucodon	Malix, im Haus, 8+9.12.02	Positiv	Positiv
		Herz	Negativ	Positiv
145	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 5.11.03	Negativ	Negativ
146	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 10.10.03	Negativ	Negativ
147	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
148	Apodemus sp.	Malix,, Neuer Stall, 27.10.03	Negativ	Negativ
149	Microtus sp.	Malix, alter Stall, 23.10.03	Negativ	Negativ
150	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 13.11.03	Negativ	Negativ
151	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 22.02.03	Negativ	Negativ
152	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 22.02.03	Negativ	Negativ
153	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 3.10.03	Negativ	Negativ
154	Apodemus sp.	Malix, Haus, 7.01.03	Negativ	Negativ
155	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 17.10.03	Negativ	Negativ
156	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 12.02.03	Negativ	Negativ
157	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 1.10.03	Negativ	Negativ
158	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 20.10.03	Negativ	Negativ
159	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 29.09.03	Negativ	Negativ
160	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 29.10.03	Negativ	Negativ
161	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 1.11.03	Negativ	Negativ
162	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
163	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 20.04.03	Negativ	Negativ
164	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 29.10.03	Negativ	Negativ
165	Clethrionomys glareolus	Malix, alter Stall, 19.09.03	Negativ	Negativ
166	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 4.11.03	Negativ	Negativ
167	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 6.11.03	Negativ	Negativ
168	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 21.10.03	Negativ	Negativ
169	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 31.10.03	Negativ	Negativ
170	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ
171	Apodemus sp.	Unbekannt	Negativ	Negativ

Nr.	Spezies	Herkunft/Sammeldatum	Immunhistologie	Real-Time RT-PCR
172	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 26.10.03	Negativ	Negativ
173	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 27.10.03	Negativ	Negativ
174	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 23.11.03	Negativ	Negativ
175	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 26.10.03	Negativ	Negativ
176	Apodemus sp.	Malix, neuer Stall, 34.10.03	Negativ	Negativ
177	Apodemus sp.	Malix, im Keller, 6.12.03	Negativ	Negativ
178	Apodemus sp.	Malix, 20.11.03	Negativ	Negativ
179	Apodemus sp.	Malix, alter Stall, 18.09.03	Negativ	Negativ
180	Maus	Kontrolltier, 15.3.2005	Negativ	Negativ
181	Maus	8.11.2004	Negativ	Negativ
182	Maus	8.11.2004	Negativ	Negativ
183	Maus	29.5.2004	Negativ	Negativ
184	Maus	29.5.2004	Negativ	Negativ
185	Maus	29.5.2004	Negativ	Negativ
186	Maus	4.2.2004	Negativ	Negativ
		Herz	Negativ	Negativ
187	Maus	4.2.2004	Negativ	Negativ
		Herz	Negativ	Negativ
188	Maus	30.5.2004	Negativ	Negativ
189	Maus	30.5.2004	Negativ	Negativ
190	Maus	30.5.2004	Negativ	Negativ
191	Maus	27.8.2004	Negativ	Negativ
192	Maus	14.10.2004	Negativ	Negativ
193	Maus	14.10.2004	Negativ	Negativ
194	Maus	14.10.2004	Negativ	Negativ
195	Maus	14.10.2004	Negativ	Negativ
196	Maus	29.9.2004	Negativ	Negativ
197	Maus	29.9.2004	Negativ	Negativ
198	Maus	29.9.2004	Negativ	Negativ
199	Maus	29.9.2004	Negativ	Negativ
200	Maus	17.10.2004	Negativ	Negativ
201	Maus	17.9.2004	Negativ	Negativ
202	Maus	7.11.2004	Negativ	Negativ
203	Maus	23.9.2004	Negativ	Negativ
204	Maus	18.11.2004	Negativ	Negativ
205	Maus	21.9.2004	Negativ	Negativ
206	Maus	23.1.2005	Negativ	Negativ
207	Maus	20.9.2004	Negativ	Negativ
208	Maus	3.11.2004	Negativ	Negativ
209	Maus	4.6.2004	Negativ	Negativ
210	Maus	29.8.2004	Negativ	Negativ
211	Maus	6.11.2004	Negativ	Negativ
212	Maus	30.5.2004	Negativ	Negativ
213	Maus	26.3.2004	Negativ	Negativ
214	Maus	17.2.2004	Negativ	Negativ

Nr.	Spezies	Herkunft/Sammeldatum	Immunhistologie	Real-Time RT-PCR
215	Maus	27.9.2004	Negativ	Negativ
216	Maus	31.5.2004	Negativ	Negativ
217	Maus	28.1.2005	Negativ	Negativ
218	Maus	21.10.2004	Negativ	Negativ
219	Maus	23.1.2005	Negativ	Negativ
220	Maus	27.9.2004	Negativ	Negativ
221	Maus	12.10.2003	Negativ	Negativ
222	Maus	27.8.2004	Negativ	Negativ
223	Maus	30.9.2004	Negativ	Negativ
224	Maus	3.6.2004	Negativ	Negativ
225	Maus	11.10.2004	Negativ	Negativ
226	Maus	2.10.2004	Negativ	Negativ
227	Maus	19.9.2004	Negativ	Negativ
228	Maus	11.11.2004	Negativ	Negativ
229	Maus	25.9.2004	Negativ	Negativ
230	Maus	26.10.2004	Negativ	Negativ
231	Maus	18.9.2004	Negativ	Negativ
232	Maus	15.9.2004	Negativ	Negativ
233	Maus	20.10.2004	Negativ	Negativ
234	Maus	30.8.2004	Negativ	Negativ
235	Maus	16.9.2004	Negativ	Negativ
236	Maus	25.8.2004	Negativ	Negativ
237	Maus	4.11.2004	Negativ	Negativ
238	Maus	27.2.2005	Negativ	Negativ
236	Maus	25.8.2004	Negativ	Negativ
237	Maus	4.11.2004	Negativ	Negativ
238	Maus	27.2.2005	Negativ	Negativ

Arvicola terrestris = Schermaus
 Apodemus sp. = Langschwanzmaus
 Apodemus sylvaticus = Waldmaus
 Clethrionomys glareolus = Rötelmaus
 Mus musculus = Hausmaus
 Microtus sp. = Wühlmaus
 Crocidura leucodon = Feldspitzmaus
 Sorex araneus = Waldspitzmaus